

**PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 E
EVOLUÇÃO CLÍNICA DO CÂNCER DE OVÁRIO: UMA ANÁLISE DE
PACIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE / BRASIL
(1996 A 2004)**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 E
EVOLUÇÃO CLÍNICA DO CÂNCER DE OVÁRIO: UMA ANÁLISE DE
PACIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE / BRASIL
(1996 A 2004)**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a
obtenção do título de Mestre.*

Aluna: Alexandra dos Santos Zimmer

Orientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre

2007

Ficha Catalográfica

Z72p Zimmer, Alexandra dos Santos

Perfil Imunohistoquímico das Proteínas da Família BCL-2 e evolução clínica do câncer de ovário: uma análise de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil (1996 a 2004) / Alexandra dos Santos Zimmer ; orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2007.

197 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Neoplasias ovarianas 2. Evolução clínica 3. Proteínas proto-oncogênicas c-bcl-2 4. Proteína supressora de tumor p53 5. Carcinoma 6. Hospital de Clínicas de Porto Alegre I. Edelweiss, Maria Isabel Albano II. Título.

NLM: WP 322

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedicatórias

Ao meu marido, **Karl**, porque junto com ele, tudo vale a pena.

Ao meu filho, **Arthur**, porque existem coisas na vida que não têm preço, nem tamanho ou definição.

Aos meus pais, **Judite e Dilceu**, porque me fizeram ser o que sou.

Aos meus irmãos, **Andréa, Lucas e Davi**, porque são meus eternos companheiros.

Ao **Leandro e a Marina**, irmãos que escolhi.

Ao meu sobrinho **Leonardo**, o melhor sobrinho do mundo.

À **Daniela Fedrizzi, Daniella Borges Machado, Márcia Andréia de Oliveira Schneider, Márcia Barcaro e Viviani Draghetti**, irmãs que me escolheram e ampararam em momentos que só nós sabemos.

Aos **pacientes**, porque são eles a razão primeira e também a última, do meu trabalho.

Agradecimentos

Ao **Serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, onde recebi a minha formação em oncologia clínica.

Às minhas queridas amigas e colegas patologistas **Luise Meurer e Raquel Ilgenfritz**, que não mediram esforço no desenvolvimento deste trabalho e sem as quais ele não teria sido possível.

À minha Orientadora, **Maria Isabel Albano Edelweiss**, pelo estímulo constante, a positividade contagiante e o apoio incondicional.

Ao amigo e colega **Cláudio Garcia Brunstein**, pelos ensinamentos durante a residência em Oncologia Clínica e pelo estímulo ao iniciar este trabalho.

À brilhante equipe da **Oncologia Genital do Serviço de Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Heleusa Mônico, Márcia Appel Binda, Valentino Magno, Ricardo Reis e Waldemar Rivoire** - parte importante deste trabalho.

Ao bioestatístico **Jan Bogaerts e demais colegas do EORTC**, pelo incentivo e por dividirem seu conhecimento em pesquisa.

À minha colega e “mentora” **Paula Raffin Pohlmann**, um exemplo de oncologista, cientista e ser humano.

À minha colega e incentivadora **Daniela Dornelles da Rosa**, que acredita que tudo sempre é possível.

Aos **funcionários do SAME – HCPA e do Serviço de Patologia-HCPA**, pela paciência e pelo auxílio ao longo desses dois anos.

Ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Programa de Pós-graduação Ciências Médicas** pelo apoio financeiro.

A **Deus**, que possibilita tudo.

Sumário

Dedicatórias	4
Agradecimentos	5
Lista de abreviaturas e siglas	9
Lista de tabelas	11
Lista de figuras	13
Lista de anexos	15
Resumo	16
Abstract	17
1.1 Introdução	19
1.2 Epidemiologia do câncer de ovário	20
1.3 Patologia	21
1.4 Tratamento	26
1.4.1 Cirurgia	26
1.4.2 Quimioterapia	27
1.4.3 Perspectivas de Novos Tratamentos	31
1.5. Apoptose e Câncer	33
1.5.1 Oncogênese	33
1.5.2 Apoptose	33
1.6 Proteínas da Família Bcl-2	36
1.7 Terapia Oncológica com Alvos Moleculares	41
1.8 Proteínas da Família Bcl-2 e Câncer	43
1.9 Proteínas da Família Bcl-2 e Câncer de Ovário	47
2.1 Justificativa para a realização do estudo	52
2.2 Objetivos	52
2.3 Referências Bibliográficas da Revisão da Literatura	53
3. Artigo em português	69
3.1 Resumo	70
3.2 Introdução	71

3.3. Métodos	74
3.4. Resultados	79
3.5 Discussão	85
3.6 Referências bibliográficas	91
3.12 Tabelas	108
3.13 Figuras	117
4. Anexos	127
5. Artigo em inglês	142
5.1 Abstract	144
5.2 Background	145
5.3 Methods	148
5.4 Results	152
5.5 Discussion	157
5.6 Bibliography	173
5.7 Tables	177
5.8 Figures	186

Lista de abreviaturas e siglas

BRCA 1 / BRCA 2 – Breast Cancer gene 1 / 2

CA-125 – Cancer Antigen 125

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

AJCC – American Joint Committee on Cancer

GOG – Gynecologic Oncology Group

GCIG – Gynaecologic Cancer Intergroup

ICON – International Collaborative Ovarian Neoplasm Study

HER2/neu – epidermal growth factor receptor

VEGF – Vascular endothelial Growth Factor

DNA – Ácido Desoxi-ribonuclêico

TNF – Fator de Necrose Tumoral

Apaf-1 – Fator Ativador da Protease na Apoptose 1

RE – Retículo Endoplasmático

PDGFR – Platelet-derived Growth Factor Receptor

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

GIST – Gastrointestinal Stromal Tumor

EGFR – Endothelial Growth Factor Receptor

cDNA – Ácido Desoxi-Ribonuclêico citoplasmático

mRNA – Ácido Ribonuclêico mensageiro

LLC – Leucemia Linfocítica Crônica

SLD – Sobrevida Livre de Doença

SG – Sobrevida Geral

CAP – Ciclofosfamida, Adriamicina e Cisplatina.

TGI – Trato gastrointestinal

NF – Neutropenia Febril

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CID-10 – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde, Décima Revisão

OMS – Organização Mundial da Saúde

GPPG HCPA-UFRGS – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lista de tabelas

Tabela 1	Tratamento quimioterápico do Carcinoma Epitelial de Ovário - resultados dos principais ensaios clínicos.	27
Tabela 2	Avaliação da toxicidade do tratamento quimioterápico de primeira linha no Carcinoma Epitelial de Ovário	28
Tabela 3	Função e localização subcelular das proteínas da família Bcl-	34
Tabela 4	Resumo de estudos sobre a associação entre as proteínas da família Bcl-2 e o Carcinoma Epitelial de Ovário	57
Tabela3.7.1	Características das Pacientes (n=45)	103
Tabela3.7.2	Anticorpos utilizados da família Bcl2 e p53	104
Tabela3.7.3	Tratamento (n=45)	105
Tabela3.7.4	Resultados Imunohistoquímica (n=45)	106
Tabela3.7.5	Análise de resposta ao tratamento quimioterápico conforme expressão das proteínas em estudo	107
Tabela3.7.6	Análise de Sobrevida Livre de Doença conforme expressão das proteínas em estudo	108
Tabela3.7.7	Análise de Sobrevida Geral conforme expressão das proteínas em estudo	109
Tabela3.7.8	Estudos sobre a associação entre as proteínas da família Bcl-p53 e o Carcinoma Epitelial de Ovário	110

Table5.7.1	Patients Characteristics (n=45)	174
Table5.7.2	Antibodies used for immunohistochemical analysis.	175
Table5.7.3	Treatment (n=45)	176
Table 5.7.4	Immunohistochemical results (n=45)	177
Table 5.7.5	Treatment response analysis based on proteins expression	178
Table 5.7.6	Analysisof disease free survival based on proteins expression	179
Table 5.7.7	Analysis of Overall survival based on Proteins expression	180
Table 5.7.8	Published studies about Bcl2 family proteins, p53 protein and Epithelial Ovarian Cancer	181

Lista de figuras

Figura 3.8.1	Fluxo de pacientes	114
Figura 3.8.2	Imunohistoquímica positiva para Bcl2. (superior 100x, inferior 400x)	115
Figura 3.8.3	Imunohistoquímica positiva para Bcl-x_L. (superior 100x, inferior 400x)	116
Figura 3.9.4	Imunohistoquímica negativa para Bcl-x_L. (100x)	117
Figura 3.9.5	Imunohistoquímica positiva para Bad. (superior 100x, inferior 400x)	118
Figura 3.9.6	Imunohistoquímica positiva para Bax. (superior 100x, inferior 400x)	119
Figura 3.9.7	Imunohistoquímica positiva para p53. (superior 40x, inferior 400x)	120
Figura 3.9.8	Proteínas Bcl2 / p53 e Sobrevida Livre de Doença	121
Figura 3.9.9	Proteínas Bcl2 / p53 e Sobrevida Geral	122
Figure 5.8.1	Patients in the study	182
Figure 5.8.2	Bcl2 positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)	183
Figure 5.8.3	Bcl-x_L positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)	184

Figure 5.9.4	Bcl-x_L negative Immunohistochemical. (100x)	185
Figure 5.9.5	Bad positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)	186
Figure 5.9.6	Bax positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)	187
Figure 5.9.7	p53 positive Immunohistochemical. (top 40x, bottom 400x)	188
Figure 5.9.8	Kaplan-Meier Bcl2 / p53 proteins and Disease free survival.	189
Figure 5.9.9	Kaplan-Meier Bcl2 / p53 proteins and Overall survival	190

Lista de anexos

Anexo 4.1	Protocolo Assistencial	124-135
Anexo 4.2	Instrumento de coleta de dados clínicos	136-139

Resumo

Base teórica: Nos Estados Unidos da América (EUA) e no Norte da Europa o carcinoma de ovário é a principal causa de morte por câncer ginecológico. A maioria dos casos é diagnosticada em estágios avançados – III ou IV FIGO . A sobrevida em 5 anos neste grupo é de 30% das pacientes. O tratamento envolve cirurgia oncológica para citorredução tumoral e quimioterapia adjuvante, na maioria dos casos. A via do apoptose está envolvida no desenvolvimento tumoral e resistência ao tratamento. As proteínas da família Bcl2 são ativas na via apoptótica e sua atividade se divide em anti e pró-apoptose. Estudos em pacientes com câncer de ovário foram realizados nos EUA, Europa e Canadá e os resultados observados foram controversos com relação ao papel dessas proteínas no câncer de ovário.

Objetivos: Determinar a prevalência de Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad e p53 em uma amostra de pacientes do HCPA. Estudar a possível correlação entre a expressão dessas proteínas e aspectos de desfecho clínico (resposta ao tratamento, sobrevida total e livre de doença).

Pacientes e métodos: Foram avaliadas, retrospectivamente, 45 pacientes com diagnóstico de carcinoma epitelial de ovário, tratadas de forma padronizada no HCPA no período de 1996 a 2004. Tecido tumoral foi avaliado através da técnica de imunohistoquímica com relação à positividade para as proteínas Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad e p53.

Resultados: A prevalência das proteínas encontrada nessa amostra de pacientes foi: Bcl2 49%, Bcl-x_L 80%, Bax 98%, Bad 87% e p53 58%; apresentando similaridade, em geral , com a literatura mundial revisada. A expressão positiva da proteína p53 correlacionou-se com pior sobrevida livre de doença (16 *versus* 58 meses – p=0.04) na análise univariada. As demais proteínas não apresentaram correlações com resposta ao tratamento ou sobrevida, nesta amostra.

Conclusão: O padrão de expressão das proteínas da família Bcl-2 e da proteína p53 encontrado nesta coorte foi similar ao descrito na literatura mundial disponível. A expressão positiva de p53 demonstrou correlação com menor sobrevida livre de doença na análise univariada, o que aponta para as investigações, já em andamento, acerca desta proteína, suas mutações e potencial alvo terapêutico. As proteínas da família Bcl-2 não se correlacionaram com resposta ao tratamento ou sobrevida nesta amostra e requerem investigações em estudos prospectivos, utilizando novas tecnologias de detecção.

Abstract

Background: In the USA, Europe and Canada epithelial ovarian cancer is the principal cause of death from gynecological cancer and most patients are diagnosed in advanced stages of the disease – Stages III or IV FIGO. The 5 years survival for these patients is around 30%. Treatment is based in laparoscopy to stage and debulk the tumor volume and most cases will need chemotherapeutic treatment, based on platinum compounds. Apoptosis route is involved in the tumor development and, probably in treatment resistance also. Bcl2 family proteins are active in the apoptosis route and its activity is divided in pro and anti-apoptosis pathways. Studies in ovarian cancer and Bcl2 proteins family activity were done in USA, Europe and Canada. However, the results remain controversial concerning the role of these proteins in ovarian cancer.

Objective: Determine Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad and p53 prevalence in a sample of patients from HCPA. Evaluate a possible correlation between these proteins expression and the clinical response, as well as the survival.

Methods and patients: Forty-five patients were retrospectively analyzed. They had epithelial ovarian carcinoma diagnosed and treated in a standardized way on HCPA, between the years 1996 to 2004. Tumor tissue samples were evaluated through immunohistochemical analysis to detect positive expression of the proteins Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad and p53.

Results: The prevalence found for the studied proteins in this sample was: Bcl2 49%, Bcl-x_L 80%, Bax 98%, Bad 87% and p53 58%; similar to the levels described in the literature. Positive expression of p53 correlated with worst disease free survival (16 *versus* 58 months – p=0.04) in the univariate analysis. The other proteins did not show correlation with treatment response or with survival in this sample.

Conclusion: The expression pattern of Bcl-2 protein family and of the p53 protein in this cohort was similar to the one usually described in the literature. The positive expression of p53 was correlated with a smaller time of disease free survival in the univariate analysis. In fact, there are currently investigations about this protein and its mutations as a potential therapeutic goal. Bcl-2 family proteins did not correlate with response to treatment or survival in this sample. Prospective studies are required, as well as the use of new technologies, to know better the role of these proteins in ovarian cancer.

1. Revisão da Literatura

Base Teórica

1.1 Introdução

Poucos órgãos mostram uma variedade de tipos tumorais tão diversa quanto o ovário. Por esta razão, o diagnóstico dos tumores ovarianos e sua patogênese permanecem como um constante desafio para a equipe de profissionais que lidam com estes tumores: sejam ginecologistas, cirurgiões oncológicos, patologistas cirúrgicos, radiologistas, oncologistas clínicos ou radioterapeutas.

Na última década, avanços no conhecimento da biologia tumoral e seus padrões genéticos, moleculares e histopatológicos vêm ocorrendo. Por conta disso, novas modalidades terapêuticas têm sido estabelecidas e tratamentos direcionados a alvos tumorais específicos têm sido buscados. Esta busca também se aplica ao carcinoma epitelial de ovário e um dos possíveis alvos de tratamento a ele relacionados: moléculas proteicas da família Bcl-2 e p53.

1.2 Epidemiologia do Câncer de Ovário

Nos Estados Unidos da América (EUA) e no Norte da Europa o carcinoma de ovário é a principal causa de morte por câncer ginecológico^{1,2}. A estimativa americana, publicada pela American Cancer Society^{3,4}, é de que no ano de 2007 ocorreram 22.430 novos diagnósticos de câncer de ovário e 15.280 mortes por esta neoplasia.

O Brasil não tem uma estimativa oficial exata desses dados. O Instituto Nacional do Câncer (INCA)⁵ reporta o câncer de ovário como sendo o terceiro mais incidente entre as lesões malignas de órgãos genitais femininos, após os casos de câncer do colo do útero e corpo do útero, em dados de Mortalidade publicados em 1999. A grande maioria dos casos de carcinoma de ovário ocorre em mulheres na peri e pós-menopausa.²

Observa-se grande variação na freqüência do câncer de ovário entre diferentes áreas geográficas e diferentes grupos étnicos, com a maior incidência ocorrendo no norte da Europa e nos Estados Unidos, e uma baixa incidência em países da Ásia e África.^{2,6} A maioria dos casos é esporádica, somente 5% a 10% dos casos têm história familiar positiva.⁶ A maior incidência ocorre em mulheres entre 40 e 65 anos e 70% das pacientes encontram-se em estágios avançados da doença (estágio III ou IV) quando do diagnóstico.^{4,7}

1.3 Patologia

A maior parte das neoplasias de ovário tem origem na superfície epitélio-estromal. Na categoria carcinoma epitelial estão incluídos cerca de dois terços de todos os tumores ovarianos e aproximadamente 90% de todos os tumores ovarianos do mundo ocidental.^{2,8} Postula-se que se originem diretamente ou indiretamente do epitélio da superfície do ovário (mesotélio modificado) e do estroma subjacente. Embora os tumores da superfície epitélio-estromal sejam primariamente subclassificados de acordo com o seu componente epitelial (seroso, mucinoso, endometrióide, claras, transicionais e de células escamosas), o termo estroma é incluído na sua designação geral porque nítido componente estromal está presente em variadas quantidades em todos os subtipos e, em alguns casos, é o fator predominante.⁹

Além de serem subdivididos de acordo com o tipo celular, os tumores da superfície epitélio-estromal são subclassificados conforme três outros critérios patológicos, dois dos quais são arquiteturais (localização dos elementos epiteliais e a proporção de componentes estromais e epiteliais) e o terceiro, relacionado à quantidade de proliferação celular, o grau de atipias e a presença ou ausência de invasão estromal (benigno, borderline ou carcinoma).⁸

Alguns tumores, particularmente aqueles do subtipo seroso, podem ser exofíticos, intracísticos (endofíticos) ou ambos. A presença do componente exofítico é indicada pelo termo “superficial” que é adicionado ao seu diagnóstico final, por exemplo: adenocarcinoma papilar seroso superficial. Ao contrário, tumores com crescimento intracístico são descritos com o prefixo cisto- antes da sua designação ou por exemplo cistoadenocarcinoma seroso.

A subdivisão mais importante, do ponto de vista clínico, é a classificação tumoral em benigno, borderline ou carcinoma, pois esta designação geralmente correlaciona-se com o prognóstico.

O estágio da doença ao diagnóstico permanece o principal fator prognóstico ². Os índices de sobrevida para pacientes com doença mais avançada permanecem desapontadores. Em pacientes submetidas ao tratamento adequado, baseado em cirurgia citorrredutora agressiva e combinação com quimioterapia adjuvante, a sobrevida em cinco anos é: Estágio I (93%), Estágio II (70%), Estágio III (37%) e Estágio IV (25%). ⁶ A grande dificuldade ocorre em detectar tumores em estágios iniciais, mesmo assim, atualmente não existem evidências de que o *screening* reduza a mortalidade no câncer de ovário ¹⁰.

Os principais fatores de risco são: idade avançada; hereditariedade – história familiar de câncer de ovário em parentes de primeiro grau, mutações BRCA 1 / BRCA 2; reposição hormonal estrogênica pós-menopausa; síndrome de ovários policísticos e endometriose; obesidade; exposição a talco e asbesto; fatores dietéticos e tabagismo ^{2 10}. Contrariamente, o uso de anticoncepcionais orais tem efeito protetor em relação ao câncer de ovário.

O carcinoma de ovário não apresenta sintomatologia específica. Geralmente os sintomas iniciais são relacionados ao crescimento tumoral, com sensação de distensão ou dor abdominal baixa, constipação e/ou aumento da frequência urinária. Eventualmente torção ou ruptura da massa tumoral leva a um quadro agudo com necessidade de intervenção cirúrgica imediata ^{2 10}. Com o avanço da doença, quadros compressivos e/ou obstrutivos, relacionados a ascite ou à massa tumoral, são mais comuns e o exame físico pode revelar a presença de massa pélvica ¹⁰.

O antígeno CA-125 é expresso por muitos dos tumores epiteliais de ovário. Bast e cols.¹¹ demonstraram que a elevação do CA-125 era vista mais freqüentemente em mulheres com câncer de ovário (82%) do que em mulheres

da população em geral (1%), mulheres com doenças benignas (6%) ou com neoplasias não ginecológicas (28,5%). Outras condições podem elevar o CA-125, como: leiomiomas, endometriose, gestação e doenças hepáticas ou pulmonares, limitando seu uso como ferramenta diagnóstica isolada.¹²

A avaliação clínica para estabelecer o estágio do carcinoma de ovário deve incluir: avaliação bioquímica e laboratorial, imagem de tórax e abdome, e dosagem de CA-125 sérico¹⁰. Na ausência de doença metastática o estadiamento definitivo do carcinoma de ovário requer laparotomia¹⁰.

A avaliação cirúrgica deve ocorrer por laparotomia via incisão vertical para explorar adequadamente o abdome superior. O procedimento deve envolver: inspeção e palpação de todas as superfícies peritoneais, lavado peritoneal, histerectomia total, salpingo-ooforectomia bilateral, omentectomia, biópsias peritoneais de qualquer lesão suspeita de metástase ou biópsias peritoneais às cegas (diafragma à direita, goteira paracólica direita e esquerda, paredes laterais da pelve da fossa ovariana, bexiga e fundo de saco peritoneal) na ausência de doença macroscópica. Na presença de metástases peritoneais menores de 2 cm nas maiores dimensões, amostragem de linfonodos de cadeias ilíaca e para-aórtica é recomendada.¹³

O estagiamento adequado e o tratamento pós-operatório dependem diretamente da habilidade do cirurgião. E o estagiamento adequado é um fator prognóstico em termos de sobrevida geral e livre de doença, tanto em análises multivariadas quanto em análises univariadas.^{14,15} Entretanto, o estagiamento cirúrgico adequado é alcançado em 97% dos casos quando realizado por um ginecologista oncologista experiente e, em 53% e 35%, quando realizado, respectivamente, por um ginecologista ou um cirurgião geral. Conseqüentemente, a sobrevida livre de doença e a sobrevida em 5 anos, para pacientes em estágios iniciais da doença (I e II), é melhor quando a cirurgia é realizada por um ginecologista oncologista.¹³

A classificação do carcinoma de ovário por estágios, conforme a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) e do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)^{16,17} é a que segue:

Estágio I

- IA Tumor limitado ao ovário; cápsula intacta, sem tumor na superfície ovariana. Sem presença de células malignas em ascite ou lavado peritoneal.
- IB Tumor limitado a ambos ovários; cápsula intacta, sem tumor em superfície ovariana. Sem presença de células malignas em ascite ou lavado peritoneal.
- IC Tumor limitado a um ou ambos ovários. Presença de qualquer dos seguintes: ruptura em cápsula, tumor em superfície ovariana, células malignas em ascite ou lavado peritoneal.

Estágio II

- IIA Extensão ou implantes tumorais em útero e/ou trompas de falópio. Sem células malignas em ascite ou lavado peritoneal.
- IIB Extensão e/ou implantes em outros tecidos pélvicos. Sem células malignas em ascite ou lavado peritoneal.
- IIC Extensão e/ou implantes tumorais em outros tecidos pélvicos com a presença de células malignas em ascite ou lavado peritoneal.

Estágio III

- IIIA Metástases microscópicas peritoneais além da pelve (sem tumor macroscópico).
- IIIB Metástases microscópicas peritoneais além da pelve menores ou iguais a 2 cm nas maiores dimensões e/ou metástases para linfonodos regionais.
- IIIC Metástases peritoneais além da pelve maiores que 2 cm nas maiores dimensões e/ou metástases para linfonodos regionais.

Estágio IV Presença de metástases à distância

Em pacientes em estágio I do carcinoma de ovário, os principais fatores prognósticos são: grau de diferenciação, o estágio conforme a FIGO, o tipo histológico, presença ou não de aderências, presença ou não de ascite em grande volume, ruptura tumoral antes da cirurgia, neoplasia extra-capsular e idade do paciente. ¹⁸⁻²²

O prognóstico da doença além do estágio I é influenciado por vários fatores. Os fatores favoráveis mais importantes em análises multivariadas são: idade jovem, boa performance clínica, tipo celular que não mucinoso ou células claras, estágios mais precoces da doença, tumores bem diferenciados, ausência de ascite e menor quantidade de tumor residual após cirurgia de citorredução inicial. ²³⁻²⁷

A definição de uma citorredução inicial ótima varia desde a presença de uma massa tumoral residual menor de 2 cm até nenhuma evidência de tumor residual após a cirurgia. Pacientes sem tumor residual têm sobrevida melhor do que aqueles com massas tumorais residuais menores de 0,5 cm. Esse grupo, por sua vez, tem um prognóstico melhor do que pacientes com tumor residual entre 0,5 cm e 1,5 cm. ^{26,28-32}

1.4 Tratamento

1.4.1 Cirurgia

A cirurgia tem papel extremamente importante no estadiamento e tratamento do carcinoma de ovário inicial (estágios I-II FIGO). O procedimento de tratamento cirúrgico padrão, conforme descrito para estadiamento, envolve histerectomia total, salpingo-ooforectomia bilateral, omentectomia e citologia peritoneal.^{15,33}

Pacientes com doença metastática extensa, com ascite clinicamente detectável ou com carcinomatose peritoneal, tem um mau prognóstico mesmo com uma citorredução cirúrgica considerada ótima.²⁸⁻³⁰ Entretanto, a quantidade de tumor residual após a primeira cirurgia também é um fator prognóstico importante no carcinoma de ovário avançado (estágios III-IV FIGO).^{34,35} Por isso a cirurgia de citorredução primária é indicada em carcinomas de ovário avançados.^{36,37}

Considerando especificamente o estágio IV FIGO (doença metastática), o papel da cirurgia de citorredução permanece controverso e deve ser decidido de forma individualizada, de acordo com a extensão da doença metastática e condições clínicas do paciente.³⁸⁻⁴⁰

A cirurgia de citorredução de intervalo é aquela realizada em pacientes após um curso de quimioterapia inicial, geralmente após dois ou três ciclos. O objetivo é a remoção da maior quantidade possível de doença primária ou metastática para facilitar a resposta à quimioterapia posteriormente.³⁶ A principal indicação deste tipo de procedimento ocorre em pacientes cuja cirurgia inicial não foi satisfatória, ou seja, não possibilitou o chamado “*debulking* completo” ou citorredução ótima. Nessa situação a cirurgia de intervalo demonstrou oferecer melhora de sobrevida.^{41,42}

Outra possibilidade de cirurgia de intervalo é a cirurgia de citorredução realizada após a quimioterapia neoadjuvante. Em casos específicos de pacientes com carcinoma de ovário metastático, como pacientes com grande volume de metástases e más condições clínicas, pode haver espaço para esse procedimento. A cirurgia geralmente é realizada após três ciclos de quimioterapia, isso porque a possível fibrose provocada pelo tratamento é menos extensa e a resistência à quimioterapia nesse ponto do tratamento é menos freqüente do que em torno do sexto ciclo.⁴³⁻⁴⁷ Além disso existem evidências de que uma citorredução secundária, ao final do tratamento quimioterápico, tem pouca influência na sobrevida das pacientes.⁴⁸

1.4.2 Quimioterapia

As primeiras drogas quimioterápicas utilizadas com resposta no tratamento da neoplasia epitelial de ovário foram os agentes alquilantes como o melfalan e a ciclofosfamida. Estudos subseqüentes mostraram a superioridade da poliquimioterapia à base de cisplatina, com respostas em torno de 60-80%.^{1,49-51} As combinações inicialmente eram feitas com agentes alquilantes como a ciclofosfamida, com ou sem doxorubicina^{52,53}. As melhores respostas eram observadas naquele grupo de pacientes estágios III e IV FIGO submetidas a um procedimento cirúrgico com citorredução ótima⁵⁴.

No final da década de 80 o uso do paclitaxel como droga única no tratamento de segunda linha dessa neoplasia mostrou respostas em torno de 24-30% em pacientes resistentes ao tratamento com combinações baseadas em cisplatina⁵⁵. Isto deu início a uma nova era de tratamento quimioterápico do carcinoma epitelial de ovário, estabelecendo a combinação de platina com taxanos como primeira linha de tratamento⁵⁶⁻⁵⁸. O estudo GOG-111 publicado em 1996 comprovou a superioridade dessa combinação sobre a de

ciclofosfamida e cisplatina, terapia padrão até então, em termos de resposta e sobrevida para pacientes com neoplasia avançada ⁵⁹. Tal achado foi confirmado em 2000 por publicação do estudo europeu OV 10 ⁶⁰, que, em reavaliação publicada em 2003 (6,5 anos de seguimento) demonstrou a manutenção do benefício na sobrevida no grupo que recebeu paclitaxel ⁶¹. (Tabela 1)

Tabela 1 – Tratamento quimioterápico do Carcinoma Epitelial de Ovário – resultados dos principais ensaios clínicos.

Estudo	Objetivo	Estágio Clínico	N	SLD em meses		SG em meses	
GOG-111 (ref 49)							
Cisplatina+Ciclofosfamida vs Cisplatina+Paclitaxel	SLD	III c/citorredução subótima e IV	202 184	13 18	$p<0,001$	24 38	$p<0,001$
OV-10 (ref 60)							
Cisplatina+Ciclofosfamida vs Cisplatina+Paclitaxel	SLD	IIb, IIc, III e IV	338 330	16 12	$p=0,005$	36 26	$p=0,016$
GOG-132 (ref 53)							
Cisplatina vs Paclitaxel vs Cisplatina+Paclitaxel	SG e SLD	III c/citorredução subótima e IV	200 213 201	16 11 14	$p=0,002$	30 26 26	
ICON-3 (ref 159)							
Paclitaxel+Carboplatina vs Carboplatina	SG SLD e toxicidade	I a IV	478 943	17 16		36 35	
Paclitaxel+Carboplatina vs CAP			232 421				

Num modelo semelhante ao GOG 111, o GOG 132, comparou o tratamento da neoplasia de ovário avançada com cisplatina droga única,

paclitaxel droga única e a combinação das duas drogas, demonstrando vantagem na sobrevida livre de doença para os tratamentos contendo cisplatina, às custas de maior toxicidade renal, gastrointestinal e, possivelmente, neurológica. Entretanto, a sobrevida geral não foi estatisticamente diferente entre os grupos, provavelmente devido ao cruzamento entre as linhas paclitaxel e cisplatina realizado após a progressão ao tratamento inicial ⁵³. (Tabelas 1 e 2)

Os ensaios clínicos desenvolvidos na última década estabeleceram o tratamento quimioterápico de primeira linha da neoplasia epitelial de ovário como sendo a associação de derivados da platina e taxanos. Entretanto, há evidências de que, em casos selecionados, o tratamento com derivados da platina como droga única é equivalente a poliquimioterapia e oferece menor toxicidade. (Tabelas 1 e 2)

Tabela 2 – Avaliação da toxicidade do tratamento quimioterápico de primeira linha no Carcinoma Epitelial de Ovário

Estudo	Toxicidade
GOG-132 (ref 53)	
Cisplatina <i>vs</i> Paclitaxel <i>vs</i> Cisplatina+Paclitaxel	Toxicidade hematológica/TGI/renal <i>vs</i> neutropenia/NF
ICON-2 (ref 52)	
CAP <i>vs</i> Carboplatina	Leucopenia/alopecia/toxic TGI <i>vs</i> trombocitopenia
(ref 159)	
Paclitaxel+Cisplatina <i>vs</i> Paclitaxel+Carboplatina	Neurotoxicidade/TGI (abandono tto por toxic 17%) <i>vs</i> toxic hematológica (abandono tto por toxicidade 5%)
ICON-3 (ref 160)	
Paclitaxel+Carboplatina <i>vs</i> Carboplatina	Alopecia/febre/neutropenia (Pacl+Carbo) <i>vs</i> febre (CAP)
Paclitaxel+Carboplatina <i>vs</i> CAP	
GOG-158 (ref 161)	

Paclitaxel+Cisplatina vs Paclitaxel+Carboplatina	Toxicidade TGI/renal/metabólica vs neurotoxicidade semelhante
---	--

O estudo de fase III do *Gynaecologic Cancer Intergroup* (GCIG), GOG 0183-ICON 5, incluiu cinco braços experimentais para avaliar a adição de três novas drogas (topotecan, gemcitabina e doxorubicina PEG-lipossomal) no tratamento de primeira linha para carcinoma de ovário em estágios avançados, III e IV FIGO. O braço controle foi composto por paclitaxel e carboplatina. O estudo recrutou pacientes até o ano de 2004 e dados de sobrevida ainda são aguardados.^{2,62}

Diante de progressão ou recorrência do carcinoma de ovário, a escolha da terapia de salvamento vai depender do tempo e tipo de recorrência. Ressecção cirúrgica deve ser considerada para pacientes recaídas após remissões de longa duração (maiores do que 12 meses), especialmente se a recorrência for isolada e a paciente estiver em boas condições clínicas^{2,63,64}. Em outras situações o principal tratamento permanece sendo algum esquema ativo de segunda linha de quimioterapia.²

A distinção entre pacientes sensíveis ou resistentes ao tratamento quimioterápico é um ponto crítico. Geralmente, pacientes que progridem durante o tratamento ou recaem no período de seis meses após o final do tratamento inicial baseado em platina, são consideradas “resistentes à platina”. Pacientes com resposta mais duradoura à quimioterapia inicial podem responder novamente ao mesmo tratamento, baseado em platina.^{65,66}

Drogas que demonstraram atividade em doença considerada refratária à platina-paclitaxel são, por exemplo, topotecan, docetaxel, etoposide oral, doxorubicina lipossomal, gemcitabina, ifosfamida e hexametilmelamina. Todos os agentes tiveram respostas em torno de 20%, sendo raras as respostas duradouras e virtualmente nenhum caso curado. Neste grupo o tratamento é

considerado paliativo e atenção redobrada é dada aos parafefeitos e toxicidades do tratamento. A oferta de tratamento em estudos clínicos deve ser considerada.²

1.4.3 Perspectivas de novos tratamentos

Uma década após o estabelecimento da combinação platina e paclitaxel como o tratamento de primeira linha para o carcinoma de ovário, vários estudos examinam alternativas de tratamento, com o objetivo de melhorar as respostas obtidas com a associação de novos compostos.

Novos alvos têm sido testados atualmente, na oncologia em geral. No carcinoma de mama, por exemplo, a expressão do receptor de tirosina-quinase HER2/neu é contraposta pelo anticorpo monoclonal trastuzumab e, combinada com a terapia citotóxica, gera respostas em até 20% dos pacientes com doença metastática e apresenta melhora significativa em desfechos quando utilizado na terapia adjuvante.⁶⁷ Entretanto, no carcinoma de ovário, o trastuzumab já não apresenta a mesma efetividade. Os níveis expressos do receptor HER2/neu são menos da metade daqueles vistos no carcinoma de mama e, mesmo nos pacientes com expressão de HER2/neu, as respostas são desapontadoras.⁶⁸

Outro alvo específico e comum a tumores sólidos é a angiogênese. A superexpressão de fator de crescimento endotelial (VEGF) é descrita como fator prognóstico importante para recorrência do carcinoma de ovário em estágios iniciais.⁶⁹ O anticorpo monoclonal anti-VEGF: bevacizumab, por sua vez, inibe a função do VEGF, e demonstrou ser um bom agente único no tratamento de carcinomas de ovário recidivados.⁷⁰ Um estudo de fase III está em andamento (ClinicalTrials.gov identificador: NCT00262847) com o objetivo

de avaliar o uso do bevacizumab associado à quimioterapia (carboplatina e paclitaxel) no carcinoma de ovário avançado.⁷¹

1.5 Apoptose e Câncer

1.5.1 Oncogênese

O dano genético não letal é o ponto inicial da oncogênese. Essa lesão genética pode ser adquirida, por ação do ambiente (químicos, radiação, vírus), ser herdada através das células germinativas ou mesmo ser desenvolvida de forma espontânea. Um tumor, então, é formado pela expansão clonal de uma única célula precursora que sofreu alguma lesão ou modificação genética.^{72,73}

Existem quatro classes de genes, cuja função normal é reguladora, que são os principais alvos de lesões genéticas desencadeadoras de oncogênese: os protooncogenes - promotores de crescimento, os genes supressores - inibidores de crescimento tumoral, genes envolvidos no reparo do DNA e genes que regulam a morte celular programada ou apoptose. Nesse último grupo encontra-se a família de genes denominada Bcl-2.⁷²

Seis alterações são descritas como essenciais na fisiologia celular para promover o crescimento dito maligno: 1) auto suficiência em termos de fatores de crescimento; 2) resistência aos fatores inibidores de crescimento; 3) evasão do processo de apoptose; 4) capacidade de replicação celular sem limites; 5) angiogênese sustentada e 6) capacidade de invasão e metastatização para outros tecidos.⁷² Em nível molecular essa progressão tumoral resulta do acúmulo de lesões genéticas, eventualmente favorecidas por defeitos no reparo do DNA.⁷³

1.5.2 Apoptose

Apoptose é um programa, geneticamente codificado, de suicídio celular.⁷⁴ É um evento natural para remover células indesejadas, como aquelas que sofreram mutações potencialmente danosas ou alterações de controle do ciclo celular e podem vir a originar uma neoplasia, por exemplo.^{73,75} Uma cascata de eventos moleculares é desencadeada de maneiras diversas e resulta em destruição de componentes celulares vitais por enzimas chamadas caspases.⁷³

As caspases (cysteine-aspartic-acid-proteases) são proteases baseadas em cisteína, capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico, especificidade incomum entre as proteases. Atualmente 14 caspases foram identificadas, cada uma com seu substrato específico e seu grupo de alvos celulares e cada uma representando um braço efetor na cascata do programa de apoptose. Essas proteases são essenciais na rota de apoptose celular e, algumas, na atividade do sistema imune para a maturação das citocinas.⁷³

O início da apoptose ocorre essencialmente através de uma de duas vias convergentes: a via extrínseca, iniciada via receptores celulares, e a via intrínseca ou mitocondrial. Ambas convergem para a ativação das caspases.⁷³ A via extrínseca envolve a estimulação de receptores membros da família de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF).⁷⁶ A via intrínseca ocorre no contexto do aumento da permeabilidade mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma.

Fatores de crescimento e outros sinais estimulam a produção dos membros anti-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2. Quando as células são submetidas a situações de estresse (hipóxia, radiação etc) ou privadas de estímulos de sobrevivência, os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 são inativados e substituídos por membros pró-apoptóticos dessa mesma família de proteínas. O efeito dessa mudança é o aumento da permeabilidade da

membrana mitocondrial e liberação de proteínas que ativam a cascata das caspases.⁷³ Uma dessas proteínas ativadoras de caspases é o citocromo-C que, no citosol, se liga a outra proteína: o Fator Ativador da Protease na Apoptose 1 (Apaf-1) e forma um complexo protéico que irá ativar a caspase 9.^{73,77}

O ponto chave da via intrínseca de apoptose é o balanço entre moléculas pró-apoptóticas e moléculas anti-apoptóticas, que regulam a permeabilidade da mitocôndria e a liberação de proteínas desencadeadoras da morte celular e que, normalmente, estão isoladas dentro da mitocôndria.⁷³

Freqüentemente o processo de apoptose é desencadeado por um estímulo nocivo como a própria quimioterapia citotóxica.⁷⁸ É correntemente aceito que a maioria dos quimioterápicos e a radiação exercem seu efeito letal causando suficiente dano celular a ponto de ativar o programa de apoptose. Um defeito na via de apoptose pode impedir a morte da célula em resposta a alguma lesão ou toxicidade, e pode ser a razão de ocorrer resistência às drogas, já que a ativação da via de apoptose é o principal mecanismo de ação das drogas antineoplásicas.⁷⁴

1.6 Proteínas da Família Bcl-2

Os principais reguladores do processo de apoptose são os produtos do gene supressor tumoral p53 e do gene Bcl-2. A família Bcl-2 está diretamente envolvida no controle do processo intrínseco de apoptose (Figura 1).

A família de proteínas Bcl2 se divide em componentes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, conforme sua atividade funcional. Os componentes pró-apoptóticos mais conhecidos são: Bax, Bak, Bad, Bok e Bcl-Xs. Os componentes anti-apoptóticos mais conhecidos são: Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 e Bcl-W.⁷⁴ (Tabela 3).

Tabela 3 – Função e localização subcelular das proteínas da família Bcl- 2

Proteína Bcl-2	Função na apoptose	Localização em células saudias	Localização em células apoptóticas
Bcl-2	Anti	Inserido na MME-, RE e envelope nuclear	Inserido na MME, RE e envelope nuclear
Bcl-x _L	Anti	Citosol, MME inserida (fracamente ligado)	MME inserida
Bax	Pró	Citosol, RE e MME (fracamente ligado)	MME inserida RE inserida
Bad	Pró	Citosol	MME

MME – membrana mitocondrial externa; RE – retículo endoplasmático.
Adaptado de ⁷⁹

Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1) têm três ou quatro regiões extensas com seqüências de aminoácidos similares ao Bcl-2 (Bcl-2 homology regions) - BH1-BH4.^{73,75} Alguns membros da família, considerados mais distantes (Bax, Bcl-Xs, Bak) contém duas ou três

regiões BH e função pró-apoptótica sob condições de estresse, podendo induzir a apoptose diretamente.⁷⁵ O grupo de indutores mais potentes de apoptose é o grupo de proteínas que tem apenas uma região, a BH3, semelhante ao Bcl-2 (Bad, Bid, Bim/Bod e Blk)⁷³ e age induzindo a atividade dos produtos de Bak e Bax ou ligando-se a e inibindo a atividade das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2.⁷⁵

Os membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 interagem fisicamente entre si⁷³ e formam homo ou heterodímeros. A proporção relativa entre essas proteínas pró ou antiapoptose vai determinar a sensibilidade celular ao estímulo desencadeador do processo apoptótico.⁷⁴

Assim também, ocorre uma relação entre o gene p53 e a família Bcl2. O gene p53 é um ativador direto da transcrição do gene Bax^{80,81}, mas níveis suficientemente elevados de Bax podem suprimir a necessidade de ativação do p53 em algumas formas de apoptose induzidas por quimioterapia⁸². A proteína Bax, quando nessas quantidades elevadas, pode diminuir o ponto de gatilho para indução de apoptose nas células e pode, inclusive, mediar a morte celular por efeitos diretos na integridade e funcionamento da mitocôndria.⁸³

O produto do Bcl-X, gene associado ao Bcl2, funciona como um tipo independente de regulador de apoptose. Ele codifica tanto o Bcl-x_L – que suprime apoptose – quanto o Bcl-x_S – um facilitador de apoptose.⁸⁴

A proteína Mcl-1 pode interagir com Bax e prolongar a viabilidade celular em diferentes situações de citotoxicidade. Apesar de sua semelhança funcional e estrutural com Bcl-2 essas duas proteínas são expressas e reguladas de formas diferentes.^{85,86}

O Bad é um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Ele regula negativamente o Bcl-2 e o Bcl-x_L. O Bad tem sua homologia a outros membros da família limitada a aminoácidos nos domínios BH1 e BH2. Da mesma forma essa proteína também não apresenta o domínio terminal carboxila

transmembrana, típico das outras proteínas da família, sugerindo que ela não seja uma proteína integral da membrana. Embora tenha sido inicialmente descrito por causa de sua ligação com o Bcl-2, o Bad se liga mais fortemente ao Bcl-x_L, inibindo mais efetivamente os efeitos anti-apoptóticos desse último, conforme observado em linhagens celulares.⁸⁷

A forte ligação entre proteínas Bad e Bcl-x_L seqüestra o Bcl-x_L, deixando a proteína Bax livre e restaurando a rota de morte celular. A proteína Bad libera a proteína Bax das ligações Bax/Bcl-2 ou Bax-Bcl-x_L que formam heterodímeros, e isso ocorre de forma diretamente dependente da concentração das proteínas envolvidas.⁸⁷

As proteínas anti-apoptóticas estão ligadas às membranas mitocondrial externa e do retículo endoplasmático, enquanto as pró-apoptóticas estão presentes na membrana mitocondrial, citoesqueleto e em forma solúvel no citoplasma ⁷⁹. Estas, quando ativadas por um estímulo nocivo, sofrem modificações pós-translacionais e conformacionais, translocam-se para a membrana mitocondrial e dão início ao processo de apoptose ⁷⁹.

O controle do apoptose parece ser exercido através da regulação da permeabilidade e integridade da membrana mitocondrial externa. As proteínas pró-apoptóticas promovem o aumento da permeabilidade desta membrana. A presença de proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas na membrana mitocondrial externa, permite a liberação de proteínas da matriz mitocondrial que desencadeiam o processo de apoptose. Entre a proteínas da matriz mitocondrial liberadas estão o *Citocromo c* e *Smac/Diablo* ⁸⁸. O *Citocromo c* ativará a caspase 9 que ativará a cascata proteolítica das caspases, enquanto a *Smac/Diablo* bloqueará os proteínas inibidoras de apoptose, impedindo que elas bloqueiem a atividade das caspases ativadas, e induzindo morte celular ⁸⁹.

As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 formam heterodímeros com os membros pró-apoptóticos da mesma família, impedindo a ligação destes últimos à membrana mitocondrial externa. Desta forma, não há

permeabilização da membrana mitocondrial, nem liberação destas proteínas, mantendo, portanto, a célula viva ⁹⁰. Além disso, estas proteínas controlam a disponibilidade intracelular de cálcio a partir do retículo endoplasmático. Embora o mecanismo ainda não seja completamente conhecido, a redução das reservas de cálcio no RE aparentemente protege as células de estímulos apoptóticos ⁹¹.

Existem, pelo menos duas teorias de como as proteínas da família Bcl-2 promovem o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial. Em primeiro lugar a ligação de membros pró-apoptóticos desta família a membrana mitocondrial externa poderia induzir diretamente a formação de poros, grande o suficiente para permitir a saída dos mediadores de apoptose como o *Citocromo c*. Uma alternativa seria a regulação, por proteínas da família Bcl-2, de canais pré-existentes como o poro de transição da permeabilidade (PTP). Ambos mecanismos possuem evidências experimentais que os apóiam, mas qual deles é mais relevante do ponto de vista biológico ainda é alvo de investigação ^{88,90}.

Algumas proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 estão localizadas no citoesqueleto, sendo liberadas a partir de um estímulo apoptótico. Além disso, durante o processo de apoptose pode haver seqüestro de proteínas anti-apoptóticas no citoesqueleto. A presença destas proteínas no citoesqueleto sugere que esta família de proteínas esteja envolvida nas alterações do citoesqueleto que ocorrem durante o processo de morte celular ⁹¹.

Como um todo, o balanço entre a atividade de proteínas pró e anti-apoptóticas definirá a viabilidade celular. Os processo de proliferação e morte celular são interligados. A desregulação de estímulos para proliferação, induz a transcrição de fatores que levarão a morte celular por apoptose como um mecanismo natural para evitar o surgimento de tumores. Para que uma célula, que sofreu uma mutação em um gene ligado à proliferação celular, possa formar um tumor, é necessário que ela possa evitar o processo de apoptose. Mutações que desregulam os mecanismos de controle da morte celular e

impedem a apoptose são comuns em muitos tumores. Mas, para que o tumor progrida e se mantenha viável, é necessário que exista um “ambiente” anti-apoptótico já que durante sua progressão o tumor enfrentará hipóxia, deficiência de nutrientes e encurtamento do telômero, que são circunstâncias indutoras de apoptose ⁹²⁻⁹⁴.

Em células malignas existe, freqüentemente, um desequilíbrio entre a expressão de proteínas da família Bcl-2 pró e anti-apoptóticas. Um excesso de Bcl-2 ou Bcl-x_L, proteínas anti-apoptóticas, pode estar presente em mais da metade de casos de câncer.⁹⁴ Por outro lado, a perda da expressão de membros pró-apoptóticos, como Bax, também pode ocorrer. Um exemplo disso é o que ocorre com a proteína p53, que normalmente estimula a rota de produção da proteína pró-apoptótica Bax; conseqüentemente, a inativação do p53 levaria à diminuição da expressão da Bax. Este tipo de desequilíbrio é responsável pela sobrevivência dos tumores frente a grande pressão de seleção que sofrem conforme mencionado acima ⁹².

A natureza dinâmica da regulação da família de proteínas Bcl-2 faz pensar que a determinação imunohistoquímica de um limitado número dessas interações num ponto único no tempo pode não ser a melhor maneira para avaliar seu real efeito na citotoxicidade por drogas. O jogo dinâmico entre diferentes proteínas é que vai determinar o gatilho para apoptose em células individuais. A resistência a múltiplas drogas pode encontrar sua resposta nesse cenário clínico, provavelmente não em um fator único.⁷⁴

1.7 Terapia oncológica com Alvos Moleculares

Nos últimos anos, com os avanços na área de biologia celular e molecular, houve o surgimento de um grande número de compostos com a capacidade de atuar sobre a atividade de alvos celulares específicos de determinados tipos de tumor. O exemplo mais bem sucedido desta nova era de desenvolvimento de drogas para o tratamento do câncer é o mesilato de imatinib que antagoniza as tirosino quinases Abl, c-kit e PDGFR⁹⁵. Esta droga apresentou, já em estudos iniciais, respostas objetivas nunca antes observadas em LMC e GIST. Em quase todos os casos LMC e GIST existe uma ativação constitucional Abl e c-kit, respectivamente. Desta forma, a especificidade do efeito anti-tumoral está diretamente relacionado a presença da alteração molecular⁹⁶.

A terapia anti-tumoral dirigida a alvos celulares e moleculares também pode ser feita através do uso de anticorpos monoclonais. Linfomas B e câncer de mama HER2/neu positivo podem ser tratados efetivamente com os anticorpos monoclonais anti-CD20 rituximab e anti-HER2/neu trastuzumab, respectivamente^{97,98}.

Aparentemente, os melhores resultados com tratamento do câncer direcionada a alvos celulares e moleculares dependem da demonstração da presença e da importância do alvo na patogenia e progressão do tumor. Isto pode ser ilustrado a partir dos estudos com o uso do inibidor de tirosino quinase: gefitinib em câncer de pulmão^{99,100}. Nestes estudos, não era exigido a testagem do tumor para o aumento da expressão da proteína alvo, o receptor tirosino quinase EGFR. O resultados destes estudos foram desapontadores, não demonstrando vantagem em associar o gefitinib à quimioterapia convencional. Uma análise retrospectiva mostrou que apenas uma minoria dos

pacientes incluídos nestes estudos apresentava mutação do EGFR ¹⁰¹. A prevalência de mutações parece variar de acordo com a etnia do paciente ¹⁰².

1.8 Proteínas da família Bcl-2 e Câncer

O gene Bcl-2 foi inicialmente isolado como um protooncogene e ratos transgênicos que apresentavam super expressão de Bcl-2 em linfócitos eram claramente mais propensos a tumorigênese do que seus controles.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Posteriormente evidenciou-se que os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 podem agir como supressores tumorais.^{107,108}

O desequilíbrio na expressão de proteínas da família Bcl-2 em favor de proteínas anti-apoptóticas em várias neoplasias como mieloma, linfoma, glioma, carcinoma de cólon e carcinoma de ovário, pode estar relacionada a uma maior resistência às formas de tratamento convencionais. Em especial, formas de tratamento baseadas na ativação do mecanismo de morte celular programada, como a quimioterapia^{109,110} e radioterapia^{111,112}, podem ser menos eficazes.⁷³

A translocação cromossomal t(14;18)(q32;q21) está presente em mais de 60% dos linfomas foliculares humanos^{103,113} e resulta na super expressão de Bcl-2 nesse tumor.¹¹⁴ O Bcl-2 também é super expresso em outros tumores, como: neoplasia de pulmão de pequenas células^{115,116}, leucemias linfocíticas crônicas¹¹⁷, mieloma múltiplo¹¹⁸, melanoma¹¹⁹, neoplasia de próstata^{120,121}, neoplasia de colo uterino¹²², de bexiga¹²³, gástrica¹²⁴, de pâncreas¹²⁵, mama¹²⁶⁻¹²⁸ e colorretal¹²⁹⁻¹³².

Na maioria dos cânceres a expressão de Bcl-2 e Bcl-x_L em níveis elevados se correlaciona com pior sobrevida e progressão de doença¹²⁰⁻¹²⁵. Contrariamente, no câncer de mama¹²⁶⁻¹²⁸ e no colorretal¹²⁹⁻¹³², os níveis elevados de expressão de Bcl-2 foram associados com resultados favoráveis e melhora de sobrevida.

Ainda outro tipo de efeito, associado mais especificamente às proteínas Bcl-2 e Bcl-x_L, é observado: além de inibirem a apoptose em determinadas células, essas células geralmente apresentam uma pausa no ciclo celular. Em geral, elas se acumulam na fase G₀/G₁.¹³³ Em experimento com camundongos transgênicos expressando o cDNA humano do Bcl-2 em linfócitos, O'Reilly e cols.¹³³ demonstraram que a expressão do Bcl-2 pode retardar a entrada de linfócitos B e T em ciclo celular, indicaram que o Bcl-2 exerce seu efeito nessas células predominantemente durante a transição do estado quiescente G₀ para a fase inicial S e, provavelmente, tem pouco ou nenhum efeito em células que estão ciclando continuamente.¹³³

A baixa frequência de células tumorais em ciclo celular encontrada nas células do linfoma folicular e em leucemia linfocítica crônica, dois tumores de comportamento indolente em que o gene Bcl-2 foi primeiramente encontrado ativado por translocação cromossômica e descrito em humanos, encontra uma correlação com o observado no experimento de O'Reilly e cols.^{133,134}

Ação ligada ao ciclo celular também foi associada à proteína Bax. Strobel e cols.⁸² descreveram a habilidade do Bax em aumentar a citotoxicidade de drogas que interrompem a formação do fuso mitótico, como os taxanos. Ao contrário dos agentes pró-apoptóticos que exercem seu efeito através de lesão ao DNA durante a fase G₁ do ciclo celular, Bax parece servir como um monitor de danos que ocorram na fase G₂/M do ciclo celular. Questiona-se mesmo se a habilidade do Bax como regulador da resposta ao paclitaxel possa prever que a perda da função do Bax em determinados tumores poderia levar a um estado de resistência a essa droga.

Nos últimos anos houve intensa investigação na tentativa de se desenvolver formas de reverter o bloqueio à apoptose causado pelo desequilíbrio na expressão de proteínas da família Bcl-2. As estratégias testadas incluem a expressão, através de vetores virais, da proteína Bax pró-apoptótica, e o bloqueio da expressão do Bcl-2, anti-apoptótico, com o uso de oligonucleotídeos anti-senso resistentes à nuclease. Também vem sendo

investigada a possibilidade de antagonizar o efeito protetor do Bcl-2/Bcl-x_L através do bloqueio, com pequenos peptídeos, de domínios essenciais para esta função destas proteínas.

Um agente terapêutico que inibisse especificamente a função anti-apoptótica do Bcl-2 ou seus homólogos, mas não afetasse ou até aumentasse sua capacidade de retardar a entrada em ciclo celular, poderia ser útil para a terapia oncológica. Neoplasias que apresentam alterações em proteínas envolvendo a sinalização de apoptose são geralmente resistentes à quimioterapia e mais difíceis de tratar usando agentes quimioterapêuticos, que exercem seu efeito através da indução de apoptose. Assim, drogas que restaurem a apoptose podem ser efetivas contra diferentes neoplasias, talvez utilizadas em combinação com quimioterápicos.⁷⁵

Os oligonucleotídeos anti-senso anti-Bcl-2, estão em fase avançada de desenvolvimento clínico, um exemplo é chamado oblimersen sodium¹³⁵. O oblimersen se liga ao mRNA do Bcl-2 humano e o degrada, provocando a diminuição na translação da proteína Bcl-2.¹³⁵ O oblimersen foi estudado em ensaios clínico fase III no tratamento de melanoma, mieloma múltiplo e leucemia linfocítica crônica (LLC). O estudo em melanoma comparou seu uso associado à dacarbazina com dacarbazina droga única, e não encontrou diferença em sobrevida a que se propunha.¹³⁶ Em mieloma múltiplo o uso de oblimersen associado à dexametasona foi comparado ao uso de dexametasona droga única, e não comprovou benefício clínico.¹³⁷ Mas, em LLC, o uso de oblimersen associado a fludarabina e ciclofosfamida comparado com o mesmo tratamento sem oblimersen, e a combinação com o oligonucleotídeo evidenciou melhora na resposta ao tratamento.⁷⁵

Uma das razões para que as respostas observadas nesses ensaios clínicos não sejam expressivas é o fato de o oblimersen ter como alvo apenas o Bcl-2. Pode se fazer necessário atingir mais de um membro da família Bcl-2 para apresentar eficácia e evitar a resistência ao tratamento. Com esse objetivo uma molécula antisenso específica contra Bcl-2 e Bcl-x_L foi desenvolvida e

pode se tornar opção terapêutica, tendo disponíveis apenas resultados em estudos de fase I.¹³⁸ Da mesma forma outras moléculas com diferentes especificidades contra membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 estão sendo desenvolvidas e testadas em estudos de fase I, como: peptídeos BH3 sintéticos¹³⁹⁻¹⁴¹, como o ABT 737, um potente inibidor da família Bcl-2, que se liga co Bcl-2, Bcl-x_L e Bcl-W com afinidade sub-nanomolar, e mostrou atividade sinérgica citotóxica com quimioterápicos e radioterapia em várias linhagens de células tumorais.¹⁴²

Por outro lado, utilizar os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 como estímulo para apoptose pode vir a ser também uma opção terapêutica. Nesse intuito Tai e cols. demonstraram a possibilidade de realizar a expressão tumoral seletiva da proteína pró-apoptótica Bax, através de transferência genética por vetores.¹⁴³ Neste estudo o vetor utilizado foi o adenovírus, provocando a expressão de Bax em células tumorais implantadas em camundongos. A expressão aumentada de Bax foi efetiva e provocou a destruição de células tumorais, especificamente as de linhagem de carcinoma de ovário.¹⁴³

1.9 Proteínas da Família Bcl-2 e Câncer de Ovário

O padrão de expressão de proteínas da família Bcl-2 é diferente entre o tecido ovariano normal e maligno ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. A proteína Bcl-2, por exemplo, está presente no tecido ovariano normal mais freqüentemente do que em carcinomas epiteliais de ovário ^{144,145}, enquanto Bax e Bcl-x_L têm padrão oposto ¹⁴⁴. Existe uma aparente correlação entre a diminuição da expressão da Bcl-2 e a evolução para neoplasia ¹⁴⁷. Em geral, cerca de um terço dos carcinomas epiteliais de ovário expressam a proteína Bcl-2 ^{147,148}. Alguns estudos associam alteração na expressão de proteínas da família Bcl-2 em carcinoma epitelial de ovário à expressão da proteína p53 ^{147,149}. A proteína p53 controla apoptose induzida por proteínas da família Bcl-2, e essas proteínas demonstram relação inversa nos níveis de expressão nos tumores epiteliais ovarianos ¹⁴⁴.

Na última década uma série de estudos se propôs a demonstrar associações entre a expressão da família Bcl-2 com o carcinoma de ovário. Os resultados foram bastante variados, alguns contraditórios. (Tabela 4) Importante é observar que os padrões adotados em termos de tratamento e avaliação não foram uniformes nesses estudos. Especialmente os escores utilizados para quantificar positividade da imunohistoquímica foram variados (desde >5%¹⁵⁰, até >50%¹⁵¹), alguns realizaram a leitura apenas da expressão nuclear ¹⁵⁰ e outros desenvolveram escores diferentes associando extensão e intensidade de expressão das proteínas ^{74,147}. Em termos clínicos, as pacientes receberam, de uma forma geral, tratamentos sempre baseados em derivados de platina, embora em alguns grupos não tenha sido oferecido taxano ^{150,152}. Esses fatores dificultam a comparação entre os estudos.

Tabela 4 – Estudos sobre a associação entre as proteínas da família Bcl-2, p53 e o Carcinoma Epitelial de Ovário

Autor	N	Bcl-2	Bax	Bcl-X _L	P53	
Berker ¹⁵³ † (Turquia)	50	50%	-	-	66%	Sem associação
Herod ¹⁵⁴ † (Reino Unido)	70	57%	-	-	61%	P53 = pior sobrevida / Bcl-2 = melhor sobrevida
Mano ¹⁵⁰ † (Japão)	66	42%	-	-	45%	Bcl-2 = com pior resposta e pior sobrevida
Baekelandt ⁷⁴ * (Noruega)	185	39%	66%	62%	49%	Bcl2+ e p53- = melhor sobrevida / Bcl2 e Bax, um deles - outro + = melhor sobrevida
Chan ¹⁴⁷ † (EUA)	46	33%	-	-	54%	Associação inversa entre a expressão de Bcl-2 e p53
Marx ¹⁵⁵ † (EUA)	215	30%	47%	-	-	Bcl-2 = bom prognóstico / Bax = mau prognóstico
Henriksen ¹⁵⁶ † (Dinamarca)	50	48%	-	-	-	Associação inversa entre a expressão Bcl2 e p53 / Bcl-2- = menor sobrevida
Tai ¹⁵¹ * (EUA)	45	-	60%	-	-	Bax+ = maior resposta ao paclitaxel e maior SLD
Kupryajczyk ¹⁵² # (Polônia)	229	32%	43%	-	59%	Bax+ = RC / Bax+ com p53 + = maior SLD

* Estudos prospectivos. † Estudos retrospectivos. SLD- Sobrevida Livre de Doença RC – Resposta Completa. – negativo + positivo.

Marx e cols.¹⁵⁵ avaliaram, através de imunohistoquímica, o tecido tumoral de 215 pacientes com câncer de ovário com relação à expressão de Bcl-2 e Bax. Encontraram associação entre Bcl-2 e fatores de bom prognóstico

e entre Bax e fatores de mau prognóstico, especialmente nos casos em que o Bcl-2 não era positivo.

Em estudo semelhante, Diebold e cols.¹⁵⁷ avaliaram a expressão de Bcl-2 e p53 em 148 casos de carcinoma de ovário de diferentes estágios ao diagnóstico. A forte expressão de Bcl-2 correlacionou-se com baixo grau histológico ($p=.004$) e o acúmulo de p53 correlacionou-se com tumores de alto grau ($p<0.01$) e à presença de doença residual após cirurgia ($p<0.01$). O Bcl-2 não apresentou associação significativa com a evolução das pacientes.

Henriksen e cols.¹⁵⁶ analisaram 50 casos de carcinoma de ovário com imunohistoquímica e encontraram correlação inversa entre a expressão de Bcl-2 e p53. Pacientes com baixa ou nenhuma expressão de Bcl-2 tiveram menor sobrevida quando comparados com aqueles com forte expressão tumoral de Bcl-2, ($p=0.02$ e $p=0.01$, respectivamente).

Tai e cols.¹⁵¹ avaliaram a expressão da proteína Bax, através de técnica fosfatase alcalina anti- fosfatase alcalina em tecido fresco e dos níveis de mRNA e cDNA de Bax, através de NorthernBlot, em 45 pacientes com neoplasia de ovário em vários estágios ao diagnóstico. Os níveis de Bax considerados positivos foram arbitrariamente definidos como $>50\%$ de células tumorais corando positivamente para Bax, observado em 60% das pacientes. Os níveis elevados de Bax foram associados com aumento de resposta ao paclitaxel e melhora da sobrevida livre de doença. A análise seqüencial da região de codificação do cDNA do Bax não evidenciou mutações nas amostras das 41 pacientes avaliadas.

Mano e cols.¹⁵⁰ estudaram retrospectivamente as amostras de 66 pacientes com carcinoma de ovário. Pesquisaram através de imunohistoquímica a expressão de p53, Bcl-2 e mdm-2 (inibidor do p53). Positividade nuclear para Bcl-2 apresentou correlação inversa com a resposta ao tratamento quimioterápico nos adenocarcinomas serosos ou endometrióides. E em análise multivariada a expressão de Bcl-2 mostrou ser

um fator prognóstico negativo para sobrevida geral, Hazard Ratio 3.09 (IC 1.46 – 6.55), $p=0.003$.

A correlação entre expressão de proteínas Bcl-2 com o prognóstico do carcinoma de ovário ainda é controversa.^{153,154} Em estudo realizado na Noruega e publicado em 2000, por Baekelandt e cols⁷⁴, foram avaliados o valor prognóstico (relacionado a fatores clínicos, independente da terapia⁷⁸) e preditivo (relacionado a um tipo de tratamento específico e não a outros⁷⁸) da expressão de Bax, Bcl-2 e Mcl-1 em uma coorte de 185 pacientes consecutivas com carcinoma de ovário EC III, tratadas de maneira uniforme, com protocolo baseado em quimioterapia adjuvante com cisplatina e epirrubicina, após cirurgia de citorredução. Essas pacientes participavam de um estudo multicêntrico de tratamento de consolidação após laparotomia de *second-look*. (Sorbe B, Proc ASCO, 1996 – abstr 780) A laparotomia de *second-look* foi utilizada, então, como método de avaliação de resposta ao tratamento.⁷⁴

Esse trabalho encontrou uma prevalência de 66% (122/185) de Bax em células tumorais ovarianas, 62%(115/185) de Bcl-x_L e 53% (98/185) de Mcl-1, enquanto em 14 amostras diferentes de tecido ovariano normal esses valores corresponderam a 36%, 0 e <5%, consecutivamente.⁷⁴ Os marcadores testados não demonstraram valor prognóstico em análise multivariada de sobrevida geral ou livre de doença. Apenas doença residual pós-citorredução cirúrgica, grau de diferenciação e presença de ascite tiveram papel prognóstico significativo na análise multivariada.⁷⁴

A idéia originada desses estudos é que o prognóstico não dependa exclusivamente de uma única proteína relacionada a apoptose, mas sim, da relação entre diferentes fatores: como a combinação entre a expressão de várias dessas proteínas entre si.⁷⁴ No estudo de Baekelandt e cols. observou-se que a combinação entre expressão de Bcl-2 e Bax apresentou uma diferença significativa entre a sobrevida mediana (de 57 meses para 21 meses – $p=.011$) entre pacientes que expressavam positivamente essas duas proteínas e aquelas que expressavam positivamente apenas uma das

proteínas. Não foi demonstrada correlação entre a expressão de p53 e Bax nesse estudo, e a hipótese levantada foi que fatores pós-transcrição ou pós-translação regulem a expressão de Bax. Mas a expressão reduzida de Bax, por outro lado, foi relacionada a baixos padrões de resposta ao tratamento quimioterápico em neoplasias de mama¹⁵⁸ e ovário¹⁵¹ em outros estudos.

Em estudo retrospectivo realizado em 229 casos de carcinoma de ovário de oito centros da Polônia, Kupryjanczyk e cols.¹⁵² avaliaram a expressão de Bcl-2 e Bax em dois grupos diferentes de pacientes: p53 positivo ou negativo. As pacientes apresentavam estágios clínicos de IIB a IV e foram tratadas com quimioterapia baseada em platina, sem oferta de taxanos. O estudo não encontrou associação entre sobrevida geral e a expressão das proteínas nos dois diferentes grupos. Entretanto os casos de resposta completa apresentaram associação com baixa expressão de Bax em geral (Odds Ratio 0.53, 95% IC 0.29 – 0.99, p=0.047) e, no grupo com p53 negativo apenas, com Bcl-2 negativo (Odds Ratio 0.4, 95% IC 0.16 – 1.01, p=0.05). Em termos de sobrevida livre de doença a expressão do Bax foi associada como prognóstico de maior sobrevida no grupo p53 positivo (RR=0.39, 95%IC 0.17 – 0.88, p=0.02). O tempo exato de sobrevida não é informado pelos autores.

Existem evidências, a partir de estudos em linhagens celulares, de que a expressão do Bcl-2 está associada a resistência à platina¹⁴⁹. Em termos clínicos (*in vivo*) esta permanece uma extrapolação a partir das respostas observadas nos estudos clínicos. (Tabela 4)

2.1 Justificativa para a realização do estudo

Embora agentes terapêuticos específicos, tendo como alvo a família Bcl-2 estejam em fase de desenvolvimento avançado e as proteínas da família Bcl-2 demonstrem ter correlação com o câncer de ovário, o assunto permanece controverso. Seu padrão de uso como fator prognóstico ou alvo de tratamento ainda não encontrou utilização prática nessa neoplasia e mais estudos são necessários.

Da mesma forma, esses estudos (com exceção de Mano e cols.¹⁵⁰) foram realizados em pacientes da América do Norte e Europa, populações com maior incidência da neoplasia. Não há relato de análise semelhante em pacientes com carcinoma epitelial de ovário na América do Sul ou no Brasil.

2.2 Objetivos do presente estudo

1. Estabelecer a prevalência da expressão de proteínas da família Bcl-2 (Bcl2; Bclx_L; Bax; Bad) e p53 em tecido de carcinoma epitelial de ovário de pacientes de uma coorte retrospectiva do HCPA.
2. Verificar a presença de associação entre a expressão dessas proteínas e:
 - a. Resposta objetiva ao tratamento (parcial, completa, doença estável ou progressão de neoplasia)
 - b. Sobrevida livre de doença
 - c. Sobrevida geral

2.3 Referências bibliográficas da Revisão da Literatura

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;**56**(2):106-30.
2. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: an overview of randomised clinical trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. *Bmj* 1991;**303**(6807):884-93.
3. Colombo N, Van Gorp T, Parma G, et al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;**60**(2):159-79.
4. Jemal A SR, Ward E, et al. Statistics for 2007, www.cancer.gov
5. Câncer I-INd. Estimativas de Incidência e Mortalidade para o Brasil, 1999.
6. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;**19**(1):3-10.
7. Karlan BY MM, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: Lippincott WW, ed. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, 2005.
8. Scully RE YR, Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. Washington. DC, 1998.
9. Scully R. Histological typing of ovarian tumors. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
10. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;**351**(24):2519-29.
11. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983;**309**(15):883-7.
12. Miralles C, Orea M, Espana P, et al. Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies. *Ann Surg Oncol* 2003;**10**(2):150-4.
13. Mayer AR, Chambers SK, Graves E, et al. Ovarian cancer staging: does it require a gynecologic oncologist? *Gynecol Oncol* 1992;**47**(2):223-7.

14. Zanetta G, Rota S, Chiari S, et al. The accuracy of staging: an important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. *Ann Oncol* 1998;**9**(10):1097-101.
15. Young RC, Decker DG, Wharton JT, et al. Staging laparotomy in early ovarian cancer. *Jama* 1983;**250**(22):3072-6.
16. Shepherd JH. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;**96**(8):889-92.
17. Sobin LH, Wittekind C, International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss,, 2002.
18. Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K. Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1990;**75**(2):263-73.
19. Ahmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP, et al. Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1996;**14**(11):2968-75.
20. Bertelsen K, Holund B, Andersen JE, Nielsen K, Stroyer I, Ladehoff P. Prognostic factors and adjuvant treatment in early epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1993;**3**(4):211-218.
21. Finn CB, Luesley DM, Buxton EJ, et al. Is stage I epithelial ovarian cancer overtreated both surgically and systemically? Results of a five-year cancer registry review. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;**99**(1):54-8.
22. Sevelde P, Vavra N, Schemper M, Salzer H. Prognostic factors for survival in stage I epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1990;**65**(10):2349-52.
23. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991;**9**(7):1138-50.
24. van Houwelingen JC, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, van Oosterom AT, Neijt JP. Predictability of the survival of patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1989;**7**(6):769-73.
25. Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, et al. Long-term survival in ovarian cancer. Mature data from The Netherlands Joint Study Group for Ovarian Cancer. *Eur J Cancer* 1991;**27**(11):1367-72.

26. Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT, Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1992;**47**(2):159-66.
27. Thigpen T, Brady MF, Omura GA, et al. Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 1993;**71**(2 Suppl):606-14.
28. Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1983;**61**(4):413-20.
29. Heintz AP, Hacker NF, Berek JS, Rose TP, Munoz AK, Lagasse LD. Cytoreductive surgery in ovarian carcinoma: feasibility and morbidity. *Obstet Gynecol* 1986;**67**(6):783-8.
30. Heintz AP, Van Oosterom AT, Trimbos JB, Schaberg A, Van der Velde EA, Nooy M. The treatment of advanced ovarian carcinoma (I): clinical variables associated with prognosis. *Gynecol Oncol* 1988;**30**(3):347-58.
31. Potter ME, Partridge EE, Hatch KD, Soong SJ, Austin JM, Shingleton HM. Primary surgical therapy of ovarian cancer: how much and when. *Gynecol Oncol* 1991;**40**(3):195-200.
32. Redman JR, Petroni GR, Saigo PE, Geller NL, Hakes TB. Prognostic factors in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1986;**4**(4):515-23.
33. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 2003;**95**(2):113-25.
34. Aure JC, Hoeg K, Kolstad P. Clinical and histologic studies of ovarian carcinoma. Long-term follow-up of 990 cases. *Obstet Gynecol* 1971;**37**(1):1-9.
35. Griffiths CT, Fuller AF. Intensive surgical and chemotherapeutic management of advanced ovarian cancer. *Surg Clin North Am* 1978;**58**(1):131-42.
36. Berek JS, Trope C, Vergote I. Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer. *Ann Oncol* 1999;**10** Suppl 1:3-7.

37. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002;**20**(5):1248-59.
38. Eisenkop SM, Nalick RH, Wang HJ, Teng NN. Peritoneal implant elimination during cytoreductive surgery for ovarian cancer: impact on survival. *Gynecol Oncol* 1993;**51**(2):224-9.
39. van Dam PA, Tjalma W, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P. Ultraradical debulking of epithelial ovarian cancer with the ultrasonic surgical aspirator: a prospective randomized trial. *Am J Obstet Gynecol* 1996;**174**(3):943-50.
40. Berek JS, Bertelsen K, du Bois A, et al. Advanced epithelial ovarian cancer: 1998 consensus statements. *Ann Oncol* 1999;**10 Suppl 1**:87-92.
41. van der Burg ME, van Lent M, Buyse M, et al. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med* 1995;**332**(10):629-34.
42. Rose PG NS, Brady M, et al. A phase III randomized study of interval secondary cytoreduction in patients with advanced stage ovarian carcinoma with suboptimal residual disease: a Gynecologic Oncology Group study. ASCO 2002: 201a.
43. Rahaman J, Dottino P, Jennings TS, Holland J, Cohen CJ. The second-look operation improves survival in suboptimally debulked stage III ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* 2005;**15**(1):19-25.
44. Gadducci A, Iacconi P, Fanucchi A, Cosio S, Teti G, Genazzani AR. Surgical cytoreduction during second-look laparotomy in patients with advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000;**20**(3B):1959-64.
45. Recchia F, De Filippis S, Rosselli M, Saggio G, Carta G, Rea S. Primary chemotherapy in stage IV ovarian cancer. A prospective phase II study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001;**22**(4):287-91.
46. Mazzeo F, Berliere M, Kerger J, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery and adjuvant chemotherapy in patients with primarily unresectable, advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003;**90**(1):163-9.

47. Vergote I, van Gorp T, Amant F, Neven P, Berteloot P. Neoadjuvant chemotherapy for ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)* 2005;**19**(12):1615-22; discussion 1623-30.
48. Berek JS, Hacker NF, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Survival of patients following secondary cytoreductive surgery in ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1983;**61**(2):189-93.
49. Williams CJ, Mead GM, Macbeth FR, et al. Cisplatin combination chemotherapy versus chlorambucil in advanced ovarian carcinoma: mature results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 1985;**3**(11):1455-62.
50. Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, et al. Randomised trial comparing two combination chemotherapy regimens (Hexa-CAF vs CHAP-5) in advanced ovarian carcinoma. *Lancet* 1984;**2**(8403):594-600.
51. Omura G, Blessing JA, Ehrlich CE, et al. A randomized trial of cyclophosphamide and doxorubicin with or without cisplatin in advanced ovarian carcinoma. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 1986;**57**(9):1725-30.
52. ICON2: randomised trial of single-agent carboplatin against three-drug combination of CAP (cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin) in women with ovarian cancer. ICON Collaborators. International Collaborative Ovarian Neoplasm Study. *Lancet* 1998;**352**(9140):1571-6.
53. Muggia FM, Braly PS, Brady MF, et al. Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2000;**18**(1):106-15.
54. Thigpen JT, Blessing JA, Vance RB, Lambuth BW. Chemotherapy in ovarian carcinoma: present role and future prospects. *Semin Oncol* 1989;**16**(4 Suppl 6):58-65.
55. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989;**111**(4):273-9.
56. Rowinsky EK, Gilbert MR, McGuire WP, et al. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J Clin Oncol* 1991;**9**(9):1692-703.

57. McGuire WP. Taxol: a new drug with significant activity as a salvage therapy in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1993;**51**(1):78-85.
58. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 1995;**332**(15):1004-14.
59. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;**334**(1):1-6.
60. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**(9):699-708.
61. Piccart MJ, Bertelsen K, Stuart G, et al. Long-term follow-up confirms a survival advantage of the paclitaxel-cisplatin regimen over the cyclophosphamide-cisplatin combination in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;**13 Suppl 2**:144-8.
62. Bookman MA, Greer BE, Ozols RF. Optimal therapy of advanced ovarian cancer: carboplatin and paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel (GOG158) and an update on GOG0182-ICON5. *Int J Gynecol Cancer* 2003;**13 Suppl 2**:149-55.
63. Eisenkop SM, Friedman RL, Spirtos NM. The role of secondary cytoreductive surgery in the treatment of patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2000;**88**(1):144-53.
64. Scarabelli C, Gallo A, Carbone A. Secondary cytoreductive surgery for patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;**83**(3):504-12.
65. Markman M, Rothman R, Hakes T, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;**9**(3):389-93.
66. Cantu MG, Buda A, Parma G, et al. Randomized controlled trial of single-agent paclitaxel versus cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in patients with recurrent ovarian cancer who responded to first-line platinum-based regimens. *J Clin Oncol* 2002;**20**(5):1232-7.

67. Puglisi F, Piccart M. Trastuzumab and breast cancer. Are we just beyond the prologue of a fascinating story? *Onkologie* 2005;**28**(11):547-9.
68. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 2003;**21**(2):283-90.
69. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, et al. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;**80**(1):98-106.
70. Burger RA SM, Monk BJ, Greer B, Sorosky J. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. ASCO 2005: A5009
71. McGuire WP. Is it time for some new approaches for treating advanced ovarian cancer? *J Natl Cancer Inst* 2006;**98**(15):1024-6.
72. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;**100**(1):57-70.
73. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000;**69**:217-45.
74. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000;**18**(22):3775-81.
75. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**(11):876-85.
76. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:331-67.
77. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**304**(3):437-44.
78. Cannistra SA. When is a "prognostic factor" really prognostic? *J Clin Oncol* 2000;**18**(22):3745-7.

79. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;**80**(2):293-9.
80. Zhan Q, Fan S, Bae I, et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994;**9**(12):3743-51.
81. Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, Cannistra SA. BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**(24):14094-9.
82. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(9):4997-5002.
83. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;**74**(4):597-608.
84. Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997;**89**(2):630-43.
85. Krajewski S, Bodrug S, Gascoyne R, Berean K, Krajewska M, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am J Pathol* 1994;**145**(3):515-25.
86. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;**88**(2):386-401.
87. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):95-105.
88. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):107-13.
89. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):125-32.
90. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):133-47.

91. Annis MG, Yethon JA, Leber B, Andrews DW. There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):115-23.
92. Juin P, Geneste O, Raimbaud E, Hickman JA. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):251-60.
93. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004;**23**(16):2746-56.
94. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**(9):647-56.
95. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;**2**(5):561-6.
96. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;**346**(9):645-52.
97. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;**344**(11):783-92.
98. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;**346**(4):235-42.
99. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;**22**(5):777-84.
100. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;**22**(5):785-94.
101. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;**350**(21):2129-39.

102. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;**304**(5676):1497-500.
103. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;**226**(4678):1097-9.
104. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;**41**(3):899-906.
105. Strasser A, Harris AW, Cory S. E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene* 1993;**8**(1):1-9.
106. Linette GP, Hess JL, Sentman CL, Korsmeyer SJ. Peripheral T-cell lymphoma in lckpr-bcl-2 transgenic mice. *Blood* 1995;**86**(4):1255-60.
107. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;**275**(5302):967-9.
108. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997;**385**(6617):637-40.
109. Ohmori T, Podack ER, Nishio K, et al. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**192**(1):30-6.
110. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995;**86**(5):1903-10.
111. Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka Y. Bax and Bcl-2 expressions predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;**124**(9):503-10.
112. Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology* 1998;**52**(6):1085-90.

113. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985;**229**(4720):1390-3.
114. Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1992;**140**(5):1089-95.
115. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein. *Am J Pathol* 1994;**145**(5):1036-40.
116. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. High prevalence of bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1995;**15**(2):503-5.
117. Schena M, Larsson LG, Gottardi D, et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1992;**79**(11):2981-9.
118. Harada N, Hata H, Yoshida M, et al. Expression of Bcl-2 family of proteins in fresh myeloma cells. *Leukemia* 1998;**12**(11):1817-20.
119. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 2000;**292**(5):225-32.
120. Matsushima H, Kitamura T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kawabe K. Combined analysis with Bcl-2 and P53 immunostaining predicts poorer prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol* 1997;**158**(6):2278-83.
121. Keshgegian AA, Johnston E, Cnaan A. Bcl-2 oncoprotein positivity and high MIB-1 (Ki-67) proliferative rate are independent predictive markers for recurrence in prostate carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1998;**110**(4):443-9.
122. Rajkumar T, Rajan S, Baruah RK, Majhi U, Selvaluxmi G, Vasanthan A. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;**19**(6):556-60.
123. Ye D, Li H, Qian S, Sun Y, Zheng J, Ma Y. bcl-2/bax expression and p53 gene status in human bladder cancer: relationship to early recurrence with intravesical chemotherapy after resection. *J Urol* 1998;**160**(6 Pt 1):2025-8; discussion 2029.

124. Nakata B, Muguruma K, Hirakawa K, et al. Predictive value of Bcl-2 and Bax protein expression for chemotherapeutic effect in gastric cancer. A pilot study. *Oncology* 1998;**55**(6):543-7.
125. Friess H, Lu Z, Andren-Sandberg A, et al. Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer. *Ann Surg* 1998;**228**(6):780-7.
126. Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjanen K. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 1995;**177**(1):49-55.
127. Le MG, Mathieu MC, Douc-Rasy S, et al. c-myc, p53 and bcl-2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients. *Int J Cancer* 1999;**84**(6):562-7.
128. Nakopoulou L, Michalopoulou A, Giannopoulou I, et al. bcl-2 protein expression is associated with a prognostically favourable phenotype in breast cancer irrespective of p53 immunostaining. *Histopathology* 1999;**34**(4):310-9.
129. Sinicrope FA, Hart J, Michelassi F, Lee JJ. Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;**1**(10):1103-10.
130. Ofner D, Riehemann K, Maier H, et al. Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *Br J Cancer* 1995;**72**(4):981-5.
131. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996;**77**(2):255-64.
132. Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey NA. bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology* 1999;**35**(4):360-7.
133. O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *Embo J* 1996;**15**(24):6979-90.

134. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995;**11**(3):101-5.
135. Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;**12**(3):193-213.
136. Frantz S. Lessons learnt from Genasense's failure. *Nat Rev Drug Discov* 2004;**3**(7):542-3.
137. Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**(6):468-79.
138. Zangemeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, et al. A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res* 2000;**6**(6):2547-55.
139. Holinger EP, Chittenden T, Lutz RJ. Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem* 1999;**274**(19):13298-304.
140. Wang JL, Zhang ZJ, Choksi S, et al. Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res* 2000;**60**(6):1498-502.
141. Walensky LD, Kung AL, Escher I, et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 2004;**305**(5689):1466-70.
142. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;**435**(7042):677-81.
143. Tai YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res* 1999;**59**(9):2121-6.
144. Marone M, Scambia G, Mozzetti S, et al. bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clin Cancer Res* 1998;**4**(2):517-24.
145. Wehrli BM, Krajewski S, Gascoyne RD, Reed JC, Gilks CB. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, mcl-1, and bcl-X expression in ovarian surface epithelial tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1998;**17**(3):255-60.

146. Witty JP, Jensen RA, Johnson AL. Expression and localization of Bcl-2 related proteins in human ovarian cancers. *Anticancer Res* 1998;**18**(2B):1223-30.
147. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;**156**(2):409-17.
148. Kaur TB, Shen T, Gaughan J, et al. Premalignant lesions in the contralateral ovary of women with unilateral ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;**93**(1):69-77.
149. Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herod J, et al. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene* 1995;**11**(7):1217-28.
150. Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K, et al. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1999;**35**(8):1214-9.
151. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998;**16**(8):2583-90.
152. Kupryjanczyk J, Szymanska T, Madry R, et al. Evaluation of clinical significance of TP53, BCL-2, BAX and MEK1 expression in 229 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimen. *Br J Cancer* 2003;**88**(6):848-54.
153. Marx D, Binder C, Meden H, et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997;**17**(3C):2233-40.
154. Diebold J, Baretton G, Felchner M, et al. bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996;**105**(3):341-9.
155. Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. *Br J Cancer* 1995;**72**(5):1324-9.
156. Berker B, Dunder I, Ensari A, Cengiz SD, Simsek E. Prognostic significance of apoptotic index and bcl-2 and p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;**23**(6):505-10.

157. Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DJ. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996;**56**(9):2178-84.
158. Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH, 2nd, Krajewska M, Reed JC. Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. *Clin Cancer Res* 1997;**3**(2):199-208.
159. Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet* 2002;**360**(9332):505-15.
160. Neijt JP, Engelholm SA, Tuxen MK, et al. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000;**18**(17):3084-92.
161. Bookman MA, Greer BE, Ozols RF. Optimal therapy of advanced ovarian cancer: carboplatin and paclitaxel vs. cisplatin and paclitaxel (GOG 158) and an update on GOG0 182-ICON5. *Int J Gynecol Cancer* 2003;**13**(6):735-40.
162. Ozols RF, Schwartz PE, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001: 1597-1632.
163. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 1993;**329**(21):1550-9.
164. Pecorelli S, Benedet JL, Creasman WT, Shepherd JH. FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Int J Gynaecol Obstet* 1999;**65**(3):243-9.
165. Greene FL, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
166. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981;**47**(1):207-14.

3. Artigo em português

**Perfil Imunohistoquímico das Proteínas da Família Bcl-2 e Evolução
Clínica do Câncer de Ovário: Uma Análise de Pacientes do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre / Brasil (1996 a 2004)**

**Zimmer AS ^{*‡}, Meurer L ^{¶§}, Brunstein CG [†], Ilgenfritz R [§], Rivoire W ^Υ,
Edelweiss MI ^{*§}**

* Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Porto Alegre, Brasil;

‡ Médica Fellow Grupo Câncer de Mama – European Organization for Research and Treatment
of Cancer (EORTC), Bruxelas, Bélgica;

¶ Pós-Graduação em Gastroenterologia, UFRGS, Porto Alegre, Brasil;

§ Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brasil.

† Divisão de Hematologia, Oncologia e Transplante, Departamento de Medicina, Universidade
de Minnesota, Minneapolis, EUA;

Υ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia (HCPA), Porto Alegre, Brasil;

Autora para correspondência:

Alexandra dos Santos Zimmer

Rue Theodore De Cuyper, 129 / 26

1200 – Woluwe Saint Lambert, Brussels, Belgium

Telefone: (32) 02 774 1092

alexandra.dossantoszimmer@eortc.be

3.1 Resumo

Base teórica: Nos Estados Unidos da América (EUA) e no Norte da Europa o carcinoma de ovário é a principal causa de morte por câncer ginecológico. A maioria dos casos é diagnosticada em estágios avançados – III ou IV FIGO . A sobrevida em 5 anos neste grupo é de 30% das pacientes. O tratamento envolve cirurgia oncológica para citorredução tumoral e quimioterapia adjuvante, na maioria dos casos. A via do apoptose está envolvida no desenvolvimento tumoral e resistência ao tratamento. As proteínas da família Bcl2 são ativas na via apoptótica e sua atividade se divide em anti e pró-apoptose. Estudos em pacientes com câncer de ovário foram realizados nos EUA, Europa e Canadá e os resultados observados foram controversos com relação ao papel dessas proteínas no câncer de ovário.

Objetivos: Determinar a prevalência de Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad e p53 em uma amostra de pacientes do HCPA. Estudar a possível correlação entre a expressão dessas proteínas e aspectos de desfecho clínico (resposta ao tratamento, sobrevida total e livre de doença).

Pacientes e métodos: Foram avaliadas, retrospectivamente, 45 pacientes com diagnóstico de carcinoma epitelial de ovário, tratadas de forma padronizada no HCPA no período de 1996 a 2004. Tecido tumoral foi avaliado através da técnica de imunohistoquímica com relação à positividade para as proteínas Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad e p53.

Resultados: A prevalência das proteínas encontrada nessa amostra de pacientes foi: Bcl2 49%, Bcl-x_L 80%, Bax 98%, Bad 87% e p53 58%; apresentando similaridade, em geral , com a literatura mundial revisada. A expressão positiva da proteína p53 correlacionou-se com pior sobrevida livre de doença (16 *versus* 58 meses – p=0.04) na análise univariada. As demais proteínas não apresentaram correlações com resposta ao tratamento ou sobrevida, nesta amostra.

Conclusão: Estudos prospectivos nesse tipo de população, com a utilização das novas tecnologias como *microarray* podem ser a melhor maneira de estudar esse conjunto de proteínas que se correlacionam dinamicamente em uma intrínseca rede pró e antiapoptose.

3.2 Introdução

O carcinoma de ovário é a principal causa de morte por câncer ginecológico em países desenvolvidos.^{1,2,4} No Brasil ele ocupa a terceira posição nesse *ranking*, uma vez que tumores de cérvix e corpo do útero ainda são os primeiros colocados.⁵

A idade de maior incidência é entre os 40 e 65 anos, afetando mulheres em fase de grande produtividade de sua vida. A sintomatologia é difusa e inespecífica favorecendo o diagnóstico apenas em fases avançadas – estágios III e IV FIGO - como, de fato, é o observado em 70% dos casos.^{4,7}

O tratamento dessa neoplasia envolve uma equipe médica multidisciplinar. Inicialmente, uma equipe cirúrgica treinada e familiarizada com a biologia e o padrão de disseminação da doença permite um maior índice de cirurgias oncológicamente adequadas, o que afeta diretamente com o prognóstico dessas pacientes.¹³ A cirurgia tem por objetivos a citorredução do tumor e o estadiamento da doença, deixando na cavidade abdominal o menor volume de doença possível.^{40,159} O tratamento complementar do carcinoma de ovário envolve quimioterapia à base de platina e taxano, na maioria dos casos.^{60,159} Nessas pacientes, a quimioterapia é capaz de prolongar o intervalo livre de sintomas e a sobrevida global em cerca de 18 e 38 meses, respectivamente^{52,160,161}. Entretanto, a sobrevida geral em 5 anos ainda é de apenas 30%.⁴

A apoptose, ou morte celular programada, é importante no controle das mutações e alterações celulares no sentido de evitar o surgimento tumoral.^{73,75} Mas também é importante no tratamento desses tumores, uma vez que a quimioterapia citotóxica, como é o caso dos compostos derivados de platina, vai agir, em última análise, através desse mecanismo.^{78,74}

Os principais reguladores do processo de apoptose são os produtos do gene supressor tumoral p53 e do gene Bcl2. A família de proteínas Bcl2 divide-se em componentes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Os componentes pró-apoptóticos mais conhecidos são: Bax e Bad e os anti-apoptóticos mais conhecidos são: Bcl-2 e Bcl-x_L. Como um todo, o balanço entre a atividade de proteínas pró- e anti-apoptóticas definirá a viabilidade celular.⁷⁴

Avaliando especificamente a neoplasia de ovário, observa-se que o padrão de expressão de proteínas da família Bcl-2 é diferente entre o tecido ovariano normal e maligno¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. A proteína Bcl2, por exemplo, está presente no tecido ovariano normal mais freqüentemente que em carcinomas epiteliais de ovário^{144,145}, enquanto Bax e Bcl-x_L têm padrão oposto¹⁴⁴. Em geral, um terço dos carcinomas epiteliais de ovário expressam a proteína Bcl2^{147,148} e, aparentemente, existe uma correlação entre a diminuição da expressão da Bcl2 e a evolução para neoplasia¹⁴⁷.

Evidências, a partir de linhagens celulares de carcinomas de ovário, sugerem que a expressão da Bcl2 está associada também à resistência à platina¹⁴⁹. Entretanto, o padrão de expressão e a correlação entre expressão

de proteínas Bcl-2 com o prognóstico carcinoma de ovário em estudos clínicos realizados nos EUA, Canadá e Europa ainda é controversa ^{153,154 150 74 147 155 156}

151 152

O padrão de expressão de proteínas da família Bcl-2, favorecendo ou impedindo a apoptose, e sua relação com resistência ao tratamento quimioterápico poderia levar a um menor índice de respostas objetivas, com conseqüente menor sobrevida livre de progressão e sobrevida global. A demonstração de associação entre pior evolução clínica e menor índice de respostas objetivas ao tratamento quimioterápico, com alterações na expressão de proteínas da família Bcl-2, forneceria a base teórica para futuros estudos clínicos com tratamento específico direcionado a esta rota metabólica.

Com o objetivo de conhecer a prevalência da expressão de Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad (membros da família Bcl-2) e p53 em carcinomas de ovário em uma população do sul do Brasil, diferente da até então avaliada em estudos disponíveis, e avaliar a associação entre a expressão de primariamente Bcl-2 e Bcl-x_L com os índices clínicos de efetividade do tratamento e de Bax, Bad e p53 associadamente, desenvolvemos esse estudo em uma coorte de pacientes diagnosticadas e tratadas no HCPA entre 1996 a 2004.

3.3 Métodos

Pacientes e Amostras

Este estudo observacional de coorte histórica (ou retrospectiva) foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A amostra estudada foi constituída por pacientes com carcinoma de ovário, tratadas no HCPA no período de 1996 a 2004. Neste período, entrou em vigência a utilização de protocolo assistencial conjunto (Anexo 4.1) das equipes de Oncologia Genital e Oncologia Clínica.

Os casos foram localizados através de busca pelo código C56 (CID-10) nos registros gerais, registros cirúrgicos e registro de câncer do HCPA. Foram incluídas na análise as pacientes que preenchessem os seguintes critérios: estadiamentos clínico e cirúrgico adequados; com tecido tumoral do momento do diagnóstico disponível para análise imunohistoquímica e com dados clínicos de tratamento e seguimento disponíveis nos registros médicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foram localizados pelo CID-10 C56 - 370 pacientes, cujos registros foram revisados para preenchimento de ficha de dados clínicos (Anexo 4.2). Inicialmente, 112 casos foram censurados por não se qualificarem como carcinoma epitelial de ovário e, sim, outras patologias tumorais ovarianas (teratomas 11 casos, cistos benignos 84 casos, tumores borderline 17 casos).

Outros 85 casos apresentavam erros grosseiros na classificação do CID-10, não envolvendo patologia ovariana; e 42 registros não foram localizados.

Dos 131 casos de carcinoma de ovário identificados, 84 não alcançaram os critérios de inclusão: 35 pacientes realizaram parte de seu tratamento (cirurgia ou quimioterapia) fora do HCPA e 49 pacientes não apresentavam material disponível para análise imunohistoquímica (10 casos diagnosticados por citopatologia apenas, quatro casos sem estudo anatomopatológico ou citopatológico, 19 casos com bloco de parafina não localizado, 04 casos foram excluídos por terem recebido tratamento quimioterápico neoadjuvante (impossibilitando a análise imunohistoquímica adequada), e 10 pacientes negaram-se a receber tratamento). Dois casos receberam tratamento cirúrgico não oncológico e outros dois casos não receberam tratamento adjuvante por problemas mentais. (Figura 3.8.1)

A amostra estudada constituiu-se de 45 pacientes cuja idade mediana foi 57 anos (variando entre 22 e 83 anos). Apenas uma paciente deste grupo não foi submetida a laparotomia inicialmente. Apresentando estágio IV-FIGO ao diagnóstico, com metástases cutâneas abdominais, recebeu tratamento quimioterápico inicial. O tecido utilizado para análise imunohistoquímica foi obtido da biópsia dessa lesão antes da quimioterapia. Características gerais da população estão descritas de forma detalhada na Tabela 3.7.1.

Todas as amostras tumorais tiveram seu diagnóstico histopatológico revisado por um patologista (R.I.). Os índices clínicos – estadiamento da

neoplasia ao diagnóstico conforme a FIGO^{162,163} citorredução cirúrgica ótima (menos de 2 cm de doença residual em cavidade abdominal) ou não, resposta clínica ao tratamento (conforme os critérios da OMS¹⁶⁴), tempo de sobrevida livre de doença (em meses) e sobrevida geral (em meses) foram revisados criticamente.

O tempo de seguimento das pacientes foi considerado como sendo a data do diagnóstico até a última informação presente nos registros médicos ou data de morte.

Fator em Estudo: características clínicas da população nesta coorte.

Desfecho: variação no padrão de expressão das moléculas da família Bcl2 (Bcl2, Bclx_L, Bax, Bad) e p53.

Imunohistoquímica

Foram utilizadas amostras de tecido tumoral fixado em formalina e embebido em parafina para estudar a expressão das proteínas da família Bcl-2. Os cortes foram processados utilizando o método estreptavidina-biotina-peroxidase, com recuperação do antígeno induzida em forno de microondas e diaminobenzidina como cromógeno.

Os anticorpos utilizados e suas diluições foram podem ser observados na Tabela 3.7.2. Como controle positivo foi utilizada amostra de linfoma folicular. Os controles negativos foram incubados sem o anticorpo primário.

A avaliação da coloração de imunohistoquímica foi realizada por três patologistas (M.I.A.E, L.M. e R.I.) não informados da evolução clínica das pacientes. A graduação foi estabelecida conforme a percentagem de coloração positiva das células tumorais: zero a 10% - negativo; 11 a 25% - 1+; 26 a 50% - 2+; 51 a 75% - 3+; 76 a 100% - 4+. As análises foram geradas considerando positivos os resultados com percentagem de células coradas maior de 10%, sendo o resultado final a média das percentagens de cada observadora.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através da construção de tabelas de frequência. Diferenças em proporções foram avaliadas pelo teste de Chi-quadrado (Mehta e Patel, 1983) ou teste exato de Fisher. As correlações foram avaliadas de acordo com o coeficiente de Pearson.

As probabilidades de sobrevida geral e sobrevida livre de doença foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958) com teste Log Rank para análise univariada. As análises multivariadas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença foram feitas utilizando o modelo de regressão de Cox (Cox, 1972).

Para todos os testes valores bicaudais e $\alpha \leq 0.05$ foram considerados significativos. Todos os cálculos utilizaram o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS - versão 13.0 Chicago, Illinois).

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e GPPG HCPA-UFRGS.

3.4 Resultados

Correlações clínico-patológicas

A mediana de idade das pacientes foi de 57 anos, variando de 22 anos a 83 anos. A maioria dessas pacientes apresentou estágios avançados ao diagnóstico, 43 delas (95%) apresentavam estágio III ou IV FIGO. (Tabela 3.7.1)

O tipo histológico mais comumente observado nessa amostra foi o adenocarcinoma seroso, em 29 (65%) dos casos. Não foi identificado nenhum caso de carcinoma de células claras, conhecido na literatura como sendo associado ao pior prognóstico, juntamente com o carcinoma mucinoso. Os tipos histológicos encontrados nesta amostra foram agrupados em adenocarcinoma seroso, endometrióide (4/45), mucinoso (2/45) ou adenocarcinoma sem outra especificação (SOE) (10/45). (Tabela 3.7.1)

No que concerne ao tratamento recebido, 44 pacientes foram levadas à laparotomia para estadiamento e tratamento, uma paciente recebeu o diagnóstico a partir de área metastática e tratamento apenas quimioterápico, inicialmente. Dezenove (42%) das 44 pacientes apresentavam doença volumosa, com carcinomatose peritoneal ou atingindo abdome superior no momento da cirurgia. Entretanto, 22/44 casos (50%) tiveram como resultado do procedimento cirúrgico citorredução ótima, ou, doença residual com menos de 2 cm na cavidade abdominal. (Tabela 3.7.3)

Das 45 pacientes, duas não receberam quimioterapia na forma adjuvante, por óbito no pós-operatório (um caso por suboclusão intestinal e outro por tromboembolia pulmonar). Entre as 43 pacientes tratadas com quimioterapia, o tratamento de primeira linha foi baseado em compostos de platina em 40 pacientes (93%) e, dentre estas, associado ao paclitaxel em 32 (74%).

A resposta completa ao tratamento quimioterápico inicial (por imagem e marcador sérico) foi observada em 25/43 (58%) das pacientes, enquanto 8/43 (18%) apresentaram resposta parcial ou doença estável, 3/43 (7%) apresentaram progressão e 2/43 (4%) foram a óbito durante o tratamento, por progressão neoplásica. Uma paciente (2%) dentre as 43, abandonou o tratamento e o acompanhamento após a terceira aplicação de quimioterapia. (Tabela 3.7.3)

Numa avaliação entre os fatores prognósticos conhecidos para o carcinoma de ovário avançado - idade, performance clínica, tipo e grau histológico, estadiamento, ascite e resultado da citorredução cirúrgica - e a resposta ao tratamento quimioterápico de primeira linha, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa neste grupo de pacientes.

Das 40 pacientes tratadas com platina em primeira linha, 39 tinham informações completas de seguimento, 11 (25%) dessas foram consideradas como sendo resistentes ao tratamento quimioterápico com compostos derivados da platina (progressão em vigência de tratamento ou recidiva antes

de alcançar 06 meses do término do tratamento com esse fármaco). Não se identificou nenhuma associação significativa entre as proteínas em estudo e a presença de resistência tumoral ao tratamento com compostos de platina, nesta amostra.

Imunohistoquímica

Vinte e dois (49%) dos 45 casos apresentaram positividade para expressão da proteína Bcl-2. A maioria dos casos positivos (20/22-90%) apresentou graduações entre 20 e 55% de positividade. (Figura 3.8.1)

Dos 45 casos, 36 (80%) foram positivos para Bcl-x_L. As graduações entre 52 e 97% de positividade ocorreram em 80% (29) dos 36 casos positivos. (Figura 3.8.2)

Trinta e nove casos (39/45-87%) foram positivos para Bad. Vinte e seis (67%) desses 39 casos apresentaram entre 26 e 75% de positividade para dessa proteína entre as células tumorais. (Figura 3.8.3)

Quarenta e quatro entre o total de 45 (98%) foram positivos para Bax, a grande maioria deles (31/44-70%) com 75 a 100% de positividade. Apenas um caso apresentou-se negativo para reação com o anticorpo Bax. (Figura 3.8.4)

Dentre os 45 casos, p53 apresentou-se positivo em vinte e seis (58%). Dezoito deles (69%) com graduação de 75 a 100% de células positivas. (Figura 3.8.5 - Tabela 3.7.4)

A expressão da proteína Bcl-2 correlacionou-se positivamente com a expressão de Bad (Pearson $R = 0.378$, $p=0.011$), assim como a expressão das proteínas Bcl-x_L e Bax apresentou correlação positiva regular (Pearson $R = 0.365$, $p=0.014$). Bcl-x_L e p53 apresentaram correlação negativa fraca, sem alcançar, entretanto, significância estatística nessa amostra. (Pearson $R = -0.126$, $p=0.41$).

Examinando possíveis associações entre a expressão das proteínas estudadas e os fatores prognósticos conhecidos para o carcinoma de ovário avançado (grau e tipo histológico, idade, citorredução cirúrgica e ascite) foi encontrada correlação entre a ausência de expressão da proteína p53 e o tipo histológico seroso ($p=0.01$). As proteínas da família Bcl-2 não demonstraram associação significativa com os fatores prognósticos nesta amostra.

Com a intenção de investigar um possível valor preditivo dessas proteínas no carcinoma de ovário, correlações entre as expressões protéicas e a resposta apresentada ao final da primeira linha de tratamento quimioterápico foram testadas. Entretanto, não se identificou correlação significativa. Bcl-2 (Pearson $R = -0.71$, $p=0.66$); Bcl-x_L (Pearson $R = -0.135$, $p=0.375$); Bad (Pearson $R = 0.076$, $p=0.619$); Bax (Pearson $R = 0.018$, $p=0.9$) e p53 (Pearson $R = -0.13$, $p=0.25$).

Da mesma maneira, nenhuma forma de diferença significativa na expressão das proteínas estudadas foi demonstrada na distribuição dos casos entre os grupos com diferentes respostas ao tratamento quimioterápico. (Tabela 3.7.5)

Análise de Sobrevida

A sobrevida mediana observada foi de 24 meses (mínimo zero e máximo de 121 meses), no período de 01 de janeiro de 1996 a 31 de dezembro de 2004. A sobrevida observada em 5 anos foi de 18%.

Ao final do período de seguimento, 07 (16%) pacientes permaneceram livres de doença; recidiva ou progressão ocorreram em 22 (49%) das pacientes, das quais 18 (40%) evoluíram para óbito. Em 16 (36%) casos não foi possível a obtenção de dados recentes relacionados ao desfecho final, apenas resposta ao tratamento.

Ao analisar a Sobrevida Livre de Doença, utilizando o método Kaplan-Meier, a expressão, positiva ou negativa, das proteínas Bcl2, Bcl-x_L, Bax e Bad, não influenciou significativamente nas diferenças entre os grupos nesta amostra. A expressão negativa da proteína p53, por sua vez, demonstrou associação com uma maior sobrevida livre de doença, de 58 para 16 meses. (Log rank, $p=0.044$). (Figura 3.8.8)

Os resultados da análise multivariada de sobrevida livre de doença, incorporando os fatores prognósticos conhecidos (idade, grau, EC, citorredução e tipo histológico), protocolo de quimioterapia utilizado e resposta ao tratamento quimioterápico de primeira linha e as proteínas em estudo não apresentaram associação estatística significativa com a maior sobrevida livre de doença.

Em termos de Sobrevida Geral não se encontrou associação entre a expressão positiva ou negativa das proteínas da família Bcl-2 ou da proteína p53 com maior ou menor sobrevida na análise de Kaplan-Meier. (Figura 3.8.9)

Considerando os fatores prognósticos já conhecidos na literatura, a expressão positiva ou negativa das proteínas em estudo, o protocolo quimioterápico utilizado em primeira linha e a resposta, como completa ou não, ao final do mesmo; a análise multivariada não demonstrou significância.

3.5 Discussão

De acordo com a revisão da literatura efetuada nas bases MEDLINE, nosso estudo é o primeiro fora dos EUA, Europa ou Canadá a avaliar concomitantemente a possível relação entre quatro diferentes proteínas da família Bcl-2, proteína p53 e o carcinoma epitelial de ovário.

A população analisada nesta coorte confirmou a descrição usualmente encontrada na literatura sobre o carcinoma epitelial de ovário^{2,4,5,9,27}, conforme podemos observar nas Tabelas 1 e 2. Ressaltem-se os aspectos epidemiológicos mais comuns: mulheres de meia-idade, apresentando doença em estágios avançados e histologia predominante descrita como adenocarcinoma seroso.

Ao comparar a prevalência de expressão das proteínas da família Bcl-2 e p53 em nossa coorte, com a apresentada na literatura (Tabela 3.7.4 e 3.7.8), encontramos similaridades. Deve-se levar em conta que um dos fatores que dificulta a comparação de resultados entre os estudos é a diferença entre o padrão de leitura utilizado, técnicas e reagentes empregados, e a variabilidade inter e intra-observador, que acontece na utilização da imunohistoquímica em diferentes centros. Mesmo com relação à proteína Bcl2, cujo uso é difundido e utilizado correntemente no auxílio diagnóstico e prognóstico de outras entidades tumorais, como linfomas, por exemplo, a variação é intensa.

Com relação ao carcinoma epitelial de ovário, a expressão da proteína Bcl-2 ocorre em 40% dos casos ($\pm 10\%$) descritos em trabalhos anteriores. Nossa coorte apresentou uma positividade de 49%. Resultados superponíveis, mesmo considerando-se padrões de leitura imunohistoquímica diferentes, utilizando escores arbitrários e particulares, como nas séries publicadas por Baekelandt ⁷⁴ e Chan ¹⁴⁷, baseadas em soma de pontos de acordo com a proporção de células tumorais positivas e a intensidade desta positividade. Mano e cols.¹⁵⁰, diferentemente, consideraram positiva apenas a expressão nuclear da proteína Bcl-2, seguindo o racional de que a ligação da proteína Bcl2 à cromatina nuclear inibiria a apoptose e, portanto, teria ligação com resistência à quimioterapia e pior prognóstico. A positividade da proteína encontrada no trabalho japonês foi de 42% e este foi o único trabalho a correlacionar a expressão de Bcl-2 com pior resposta ao tratamento e pior sobrevida.^{165,166}

A proteína Bcl-x_L é uma proteína anti-apoptótica de atividade similar à Bcl-2. Sua expressão no carcinoma epitelial de ovário foi avaliada previamente apenas por Baekelandt e cols.⁷⁴, que encontraram uma positividade de 66% aplicando um escore de leitura composto por soma da extensão e intensidade da coloração e divisão do escore composto em três diferentes grupos. Encontramos 80% de positividade em nosso trabalho e a leitura foi feita considerando positivas as amostras com mais de 10% de células coradas. A comparação direta desses resultados não é, portanto, possível.

Bax é descrita com expressão positiva em torno de 40%^{152,155} ou 60%^{74,151} e foi encontrada em nosso meio com uma prevalência de 98%. É interessante observar que na análise de Tai e cols.¹⁵¹ a positividade encontrada, 60%, foi assim considerada apenas nos casos com expressão positiva em mais de 50% das células, podendo ter sido ainda maior se considerados positivos os casos com mais de 10% das células. Utilizando o critério de mais de 50% das células positivas como ponto de corte, encontramos 70% de positividade e todas as análises estatísticas foram repetidas com este critério. Os resultados, entretanto, não foram afetados. Apenas um caso em nossa amostra apresentou-se negativo para Bax, este mesmo caso foi negativo para as demais proteínas da família Bcl-2, possivelmente por inadequada fixação do material, seja por falta de tamponamento da formalina ou pelo tempo escasso ou excessivo de permanência da peça no fixador.

Estudos prévios (Tabela 3.7.8) demonstraram associações variadas das proteínas entre si, numa possível expressão da conhecida interação anti e pró-apoptótica que ocorre entre essas proteínas no contexto tumoral. Nesta população, a expressão da proteína Bcl-2 correlacionou-se positivamente com a expressão de Bad (Pearson R = 0.378, p=0.011) e Bcl-x_L com Bax (Pearson R = 0.365, p=0.014). Ambas associações entre proteínas anti-apoptóticas com proteínas pró-apoptóticas, respectivamente.

Neste contexto é interessante considerar que a proteína Bad costuma regular negativamente a atividade anti-apoptótica das proteínas Bcl-2 e Bcl-x_L,

através de sua ligação a elas, especialmente a Bcl-x_L, o que deixa a Bax livre de sua ligação com Bcl2 e Bcl-x_L⁸⁷, facilitando sua atividade pró-apoptótica sobre a membrana mitocondrial. A proteína pró-apoptótica Bad não foi analisada em nenhuma outra coorte de carcinoma epitelial de ovário anteriormente. Entretanto, a descrição de sua atividade no processo de apoptose, e em linhagens celulares desse tumor^{167,168}, embasam o racional em descrever sua prevalência nessa amostra, que foi de 87%.

A proteína p53, reconhecidamente associada ao controle de apoptose e à atividade das proteínas da família Bcl-2, tem utilização difundida e melhor padronizada, e apresentou expressão homogênea entre os estudos prévios, com expressões entre 50 e 60%. A expressão encontrada nesta amostra foi semelhante (58%) e confirmou a associação encontrada entre a positividade desta proteína e pior sobrevida livre de doença (de 16 para 58 meses, p=0.04).^{74,154} Existem descrições, em câncer de mama, de que a proteína p53 *wild type* apresenta uma meia-vida curta e, por conta disso, a técnica de imunohistoquímica expressa, na verdade, um acúmulo principalmente de proteína p53 *mutada*.¹⁶⁹ De fato, Psyri e cols.¹⁷⁰ avaliaram a expressão do p53 no carcinoma de ovário, utilizando *microarray*, e demonstraram associação com melhor sobrevida livre de doença e sobrevida geral. Trabalhos recentes com cultura celular também investigam a resposta ao tratamento quimioterápico com platina e mutações do p53 no carcinoma de ovário.¹⁷¹

Gomes e Andrade¹⁷² avaliaram a expressão imunohistoquímica da proteína p53 em uma coorte de 70 pacientes de Campinas, Brasil, e também

encontraram associação entre essa expressão e o tipo histológico carcinoma seroso. Em trabalho anterior ¹⁷³, com uma coorte de 90 pacientes, o mesmo grupo avaliou a associação da proteína p53 e da proteína Bcl-2 com sobrevida e tempo de progressão, não encontrando associação significativa. A positividade de p53 foi de 47% e de Bcl-2, 20%.

A resposta ao tratamento, sobrevida livre de doença e sobrevida geral não se associaram a diferentes níveis de expressão das proteínas família Bcl2 nessa amostra de pacientes.

Algumas evidências apontam para a associação de melhores respostas ao tratamento com paclitaxel nos casos com maior expressão da proteína Bax.^{82,151} Em nossa amostra, apenas um caso não expressou a proteína e, dos 44 que a expressaram, apenas um apresentou percentagem de células tumorais reativas à imunohistoquímica menor que 50% o que impossibilitou comparações e conclusões nesse sentido. De maneira semelhante, não foi encontrada associação entre expressão das proteínas em estudo e a resistência ao tratamento quimioterápico com compostos derivados de platina.

As dificuldades encontradas num estudo retrospectivo, em especial em um hospital de cuidados terciários que atende uma população tipicamente de nível sócio-econômico pouco privilegiado, permitindo uma perda de seguimento de até 36%, e o número pequeno de pacientes passíveis de

inclusão neste estudo, certamente devem ser pesados no julgamento desses dados.

A relação dinâmica da regulação da família de proteínas Bcl2 e p53 faz pensar que a determinação imunohistoquímica de um limitado número dessas interações num ponto único no tempo, provavelmente não é a melhor maneira de avaliar seu real papel no contexto tumoral e na citotoxicidade por drogas. Técnicas mais avançadas e específicas, como microarray e proteomics, podem detectar níveis reais de proteínas ativas e/ou mutadas, o que seria mais confiável na tentativa de correlação com desfechos clínicos. Da mesma forma, a resistência a múltiplas drogas pode encontrar sua resposta nesse cenário clínico intrincado, provavelmente não em um fator único.⁷⁴

Concluindo, o padrão de expressão das proteínas da família Bcl-2 e proteína p53, encontrado nesta amostra de pacientes com carcinoma epitelial de ovário, foi similar ao descrito na literatura mundial disponível. A expressão positiva de p53 demonstrou correlação com menor sobrevida livre de doença na análise univariada, o que aponta para as investigações já em andamento acerca desta proteína, suas mutações e potencial alvo terapêutico. As proteínas da família Bcl-2 não se correlacionaram com resposta ao tratamento ou sobrevida nesta amostra e requerem investigações em estudos prospectivos, utilizando novas tecnologias de detecção.

3.6 Referências bibliográficas

1. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: an overview of randomised clinical trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. *Bmj* 1991;**303**(6807):884-93.
2. Colombo N, Van Gorp T, Parma G, et al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;**60**(2):159-79.
3. Jemal A SR, Ward E, et al. Cancer Statistics for 2007, www.cancer.gov.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;**56**(2):106-30.
5. Câncer I-IND. Estimativas de Incidência e Mortalidade para o Brasil, 1999.
6. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;**19**(1):3-10.
7. Karlan BY MM, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: Lippincott WW, ed. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, 2005.
8. Scully RE YR, Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. Washington. DC, 1998.
9. Scully R. *Histological typing of ovarian tumors*. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
10. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;**351**(24):2519-29.
11. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983;**309**(15):883-7.
12. Miralles C, Orea M, Espana P, et al. Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies. *Ann Surg Oncol* 2003;**10**(2):150-4.
13. Mayer AR, Chambers SK, Graves E, et al. Ovarian cancer staging: does it require a gynecologic oncologist? *Gynecol Oncol* 1992;**47**(2):223-7.

14. Zanetta G, Rota S, Chiari S, et al. The accuracy of staging: an important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. *Ann Oncol* 1998;**9**(10):1097-101.
15. Young RC, Decker DG, Wharton JT, et al. Staging laparotomy in early ovarian cancer. *Jama* 1983;**250**(22):3072-6.
16. Shepherd JH. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;**96**(8):889-92.
17. Sobin LH, Wittekind C, International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss,, 2002.
18. Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K. Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1990;**75**(2):263-73.
19. Ahmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP, et al. Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1996;**14**(11):2968-75.
20. Bertelsen K, Holund B, Andersen JE, Nielsen K, Stroyer I, Ladehoff P. Prognostic factors and adjuvant treatment in early epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1993;**3**(4):211-218.
21. Finn CB, Luesley DM, Buxton EJ, et al. Is stage I epithelial ovarian cancer overtreated both surgically and systemically? Results of a five-year cancer registry review. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;**99**(1):54-8.
22. Sevelde P, Vavra N, Schemper M, Salzer H. Prognostic factors for survival in stage I epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1990;**65**(10):2349-52.
23. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991;**9**(7):1138-50.
24. van Houwelingen JC, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, van Oosterom AT, Neijt JP. Predictability of the survival of patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1989;**7**(6):769-73.
25. Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, et al. Long-term survival in ovarian cancer. Mature data from The Netherlands Joint Study Group for Ovarian Cancer. *Eur J Cancer* 1991;**27**(11):1367-72.

26. Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT, Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1992;**47**(2):159-66.
27. Thigpen T, Brady MF, Omura GA, et al. Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 1993;**71**(2 Suppl):606-14.
28. Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1983;**61**(4):413-20.
29. Heintz AP, Hacker NF, Berek JS, Rose TP, Munoz AK, Lagasse LD. Cytoreductive surgery in ovarian carcinoma: feasibility and morbidity. *Obstet Gynecol* 1986;**67**(6):783-8.
30. Heintz AP, Van Oosterom AT, Trimbos JB, Schaberg A, Van der Velde EA, Nooy M. The treatment of advanced ovarian carcinoma (I): clinical variables associated with prognosis. *Gynecol Oncol* 1988;**30**(3):347-58.
31. Potter ME, Partridge EE, Hatch KD, Soong SJ, Austin JM, Shingleton HM. Primary surgical therapy of ovarian cancer: how much and when. *Gynecol Oncol* 1991;**40**(3):195-200.
32. Redman JR, Petroni GR, Saigo PE, Geller NL, Hakes TB. Prognostic factors in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1986;**4**(4):515-23.
33. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 2003;**95**(2):113-25.
34. Aure JC, Hoeg K, Kolstad P. Clinical and histologic studies of ovarian carcinoma. Long-term follow-up of 990 cases. *Obstet Gynecol* 1971;**37**(1):1-9.
35. Griffiths CT, Fuller AF. Intensive surgical and chemotherapeutic management of advanced ovarian cancer. *Surg Clin North Am* 1978;**58**(1):131-42.
36. Berek JS, Trope C, Vergote I. Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer. *Ann Oncol* 1999;**10 Suppl 1**:3-7.

37. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002;**20**(5):1248-59.
38. Eisenkop SM, Nalick RH, Wang HJ, Teng NN. Peritoneal implant elimination during cytoreductive surgery for ovarian cancer: impact on survival. *Gynecol Oncol* 1993;**51**(2):224-9.
39. van Dam PA, Tjalma W, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P. Ultraradical debulking of epithelial ovarian cancer with the ultrasonic surgical aspirator: a prospective randomized trial. *Am J Obstet Gynecol* 1996;**174**(3):943-50.
40. Berek JS, Bertelsen K, du Bois A, et al. Advanced epithelial ovarian cancer: 1998 consensus statements. *Ann Oncol* 1999;**10 Suppl 1**:87-92.
41. van der Burg ME, van Lent M, Buyse M, et al. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med* 1995;**332**(10):629-34.
42. Rose PG NS, Brady M, et al. A phase III randomized study of interval secondary cytoreduction in patients with advanced stage ovarian carcinoma with suboptimal residual disease: a Gynecologic Oncology Group study. ASCO 2002: 201a.
43. Rahaman J, Dottino P, Jennings TS, Holland J, Cohen CJ. The second-look operation improves survival in suboptimally debulked stage III ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* 2005;**15**(1):19-25.
44. Gadducci A, Iacconi P, Fanucchi A, Cosio S, Teti G, Genazzani AR. Surgical cytoreduction during second-look laparotomy in patients with advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000;**20**(3B):1959-64.
45. Recchia F, De Filippis S, Rosselli M, Saggio G, Carta G, Rea S. Primary chemotherapy in stage IV ovarian cancer. A prospective phase II study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001;**22**(4):287-91.
46. Mazzeo F, Berliere M, Kerger J, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery and adjuvant chemotherapy in patients with primarily unresectable, advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003;**90**(1):163-9.

47. Vergote I, van Gorp T, Amant F, Neven P, Berteloot P. Neoadjuvant chemotherapy for ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)* 2005;**19**(12):1615-22; discussion 1623-30.
48. Berek JS, Hacker NF, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Survival of patients following secondary cytoreductive surgery in ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1983;**61**(2):189-93.
49. Williams CJ, Mead GM, Macbeth FR, et al. Cisplatin combination chemotherapy versus chlorambucil in advanced ovarian carcinoma: mature results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 1985;**3**(11):1455-62.
50. Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, et al. Randomised trial comparing two combination chemotherapy regimens (Hexa-CAF vs CHAP-5) in advanced ovarian carcinoma. *Lancet* 1984;**2**(8403):594-600.
51. Omura G, Blessing JA, Ehrlich CE, et al. A randomized trial of cyclophosphamide and doxorubicin with or without cisplatin in advanced ovarian carcinoma. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 1986;**57**(9):1725-30.
52. ICON2: randomised trial of single-agent carboplatin against three-drug combination of CAP (cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin) in women with ovarian cancer. ICON Collaborators. International Collaborative Ovarian Neoplasm Study. *Lancet* 1998;**352**(9140):1571-6.
53. Muggia FM, Braly PS, Brady MF, et al. Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2000;**18**(1):106-15.
54. Thigpen JT, Blessing JA, Vance RB, Lambuth BW. Chemotherapy in ovarian carcinoma: present role and future prospects. *Semin Oncol* 1989;**16**(4 Suppl 6):58-65.
55. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989;**111**(4):273-9.
56. Rowinsky EK, Gilbert MR, McGuire WP, et al. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J Clin Oncol* 1991;**9**(9):1692-703.

57. McGuire WP. Taxol: a new drug with significant activity as a salvage therapy in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1993;**51**(1):78-85.
58. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 1995;**332**(15):1004-14.
59. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;**334**(1):1-6.
60. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**(9):699-708.
61. Piccart MJ, Bertelsen K, Stuart G, et al. Long-term follow-up confirms a survival advantage of the paclitaxel-cisplatin regimen over the cyclophosphamide-cisplatin combination in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;**13 Suppl 2**:144-8.
62. Bookman MA, Greer BE, Ozols RF. Optimal therapy of advanced ovarian cancer: carboplatin and paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel (GOG158) and an update on GOG0182-ICON5. *Int J Gynecol Cancer* 2003;**13 Suppl 2**:149-55.
63. Eisenkop SM, Friedman RL, Spirtos NM. The role of secondary cytoreductive surgery in the treatment of patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2000;**88**(1):144-53.
64. Scarabelli C, Gallo A, Carbone A. Secondary cytoreductive surgery for patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;**83**(3):504-12.
65. Markman M, Rothman R, Hakes T, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;**9**(3):389-93.
66. Cantu MG, Buda A, Parma G, et al. Randomized controlled trial of single-agent paclitaxel versus cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in patients with recurrent ovarian cancer who responded to first-line platinum-based regimens. *J Clin Oncol* 2002;**20**(5):1232-7.

67. Puglisi F, Piccart M. Trastuzumab and breast cancer. Are we just beyond the prologue of a fascinating story? *Onkologie* 2005;**28**(11):547-9.
68. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 2003;**21**(2):283-90.
69. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, et al. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;**80**(1):98-106.
70. Burger RA SM, Monk BJ, Greer B, Sorosky J. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. ASCO 2005: A5009
71. McGuire WP. Is it time for some new approaches for treating advanced ovarian cancer? *J Natl Cancer Inst* 2006;**98**(15):1024-6.
72. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;**100**(1):57-70.
73. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000;**69**:217-45.
74. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000;**18**(22):3775-81.
75. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**(11):876-85.
76. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:331-67.
77. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**304**(3):437-44.
78. Cannistra SA. When is a "prognostic factor" really prognostic? *J Clin Oncol* 2000;**18**(22):3745-7.

79. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):95-105.
80. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;**80**(2):293-9.
81. Zhan Q, Fan S, Bae I, et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994;**9**(12):3743-51.
82. Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, Cannistra SA. BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**(24):14094-9.
83. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(9):4997-5002.
84. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;**74**(4):597-608.
85. Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997;**89**(2):630-43.
86. Krajewski S, Bodrug S, Gascoyne R, Berean K, Krajewska M, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am J Pathol* 1994;**145**(3):515-25.
87. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;**88**(2):386-401.
88. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):107-13.
89. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):125-32.
90. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):133-47.

91. Annis MG, Yethon JA, Leber B, Andrews DW. There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):115-23.
92. Juin P, Geneste O, Raimbaud E, Hickman JA. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):251-60.
93. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004;**23**(16):2746-56.
94. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**(9):647-56.
95. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;**2**(5):561-6.
96. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;**346**(9):645-52.
97. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;**344**(11):783-92.
98. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;**346**(4):235-42.
99. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;**22**(5):777-84.
100. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;**22**(5):785-94.
101. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;**350**(21):2129-39.

102. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;**304**(5676):1497-500.
103. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;**226**(4678):1097-9.
104. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;**41**(3):899-906.
105. Strasser A, Harris AW, Cory S. E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene* 1993;**8**(1):1-9.
106. Linette GP, Hess JL, Sentman CL, Korsmeyer SJ. Peripheral T-cell lymphoma in lckpr-bcl-2 transgenic mice. *Blood* 1995;**86**(4):1255-60.
107. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;**275**(5302):967-9.
108. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997;**385**(6617):637-40.
109. Ohmori T, Podack ER, Nishio K, et al. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**192**(1):30-6.
110. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995;**86**(5):1903-10.
111. Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka Y. Bax and Bcl-2 expressions predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;**124**(9):503-10.
112. Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology* 1998;**52**(6):1085-90.

113. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985;**229**(4720):1390-3.
114. Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1992;**140**(5):1089-95.
115. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein. *Am J Pathol* 1994;**145**(5):1036-40.
116. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. High prevalence of bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1995;**15**(2):503-5.
117. Schena M, Larsson LG, Gottardi D, et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1992;**79**(11):2981-9.
118. Harada N, Hata H, Yoshida M, et al. Expression of Bcl-2 family of proteins in fresh myeloma cells. *Leukemia* 1998;**12**(11):1817-20.
119. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 2000;**292**(5):225-32.
120. Matsushima H, Kitamura T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kawabe K. Combined analysis with Bcl-2 and P53 immunostaining predicts poorer prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol* 1997;**158**(6):2278-83.
121. Keshgegian AA, Johnston E, Cnaan A. Bcl-2 oncoprotein positivity and high MIB-1 (Ki-67) proliferative rate are independent predictive markers for recurrence in prostate carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1998;**110**(4):443-9.
122. Rajkumar T, Rajan S, Baruah RK, Majhi U, Selvaluxmi G, Vasanthan A. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;**19**(6):556-60.
123. Ye D, Li H, Qian S, Sun Y, Zheng J, Ma Y. bcl-2/bax expression and p53 gene status in human bladder cancer: relationship to early recurrence with intravesical chemotherapy after resection. *J Urol* 1998;**160**(6 Pt 1):2025-8; discussion 2029.

124. Nakata B, Muguruma K, Hirakawa K, et al. Predictive value of Bcl-2 and Bax protein expression for chemotherapeutic effect in gastric cancer. A pilot study. *Oncology* 1998;**55**(6):543-7.
125. Friess H, Lu Z, Andren-Sandberg A, et al. Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer. *Ann Surg* 1998;**228**(6):780-7.
126. Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjanen K. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 1995;**177**(1):49-55.
127. Le MG, Mathieu MC, Douc-Rasy S, et al. c-myc, p53 and bcl-2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients. *Int J Cancer* 1999;**84**(6):562-7.
128. Nakopoulou L, Michalopoulou A, Giannopoulou I, et al. bcl-2 protein expression is associated with a prognostically favourable phenotype in breast cancer irrespective of p53 immunostaining. *Histopathology* 1999;**34**(4):310-9.
129. Sinicrope FA, Hart J, Michelassi F, Lee JJ. Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;**1**(10):1103-10.
130. Ofner D, Riehemann K, Maier H, et al. Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *Br J Cancer* 1995;**72**(4):981-5.
131. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996;**77**(2):255-64.
132. Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey NA. bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology* 1999;**35**(4):360-7.
133. O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *Embo J* 1996;**15**(24):6979-90.

134. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995;**11**(3):101-5.
135. Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;**12**(3):193-213.
136. Frantz S. Lessons learnt from Genasense's failure. *Nat Rev Drug Discov* 2004;**3**(7):542-3.
137. Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**(6):468-79.
138. Zangemeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, et al. A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res* 2000;**6**(6):2547-55.
139. Holinger EP, Chittenden T, Lutz RJ. Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem* 1999;**274**(19):13298-304.
140. Wang JL, Zhang ZJ, Choksi S, et al. Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res* 2000;**60**(6):1498-502.
141. Walensky LD, Kung AL, Escher I, et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 2004;**305**(5689):1466-70.
142. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;**435**(7042):677-81.
143. Tai YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res* 1999;**59**(9):2121-6.
144. Marone M, Scambia G, Mozzetti S, et al. bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clin Cancer Res* 1998;**4**(2):517-24.
145. Wehrli BM, Krajewski S, Gascoyne RD, Reed JC, Gilks CB. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, mcl-1, and bcl-X expression in ovarian surface epithelial tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1998;**17**(3):255-60.

146. Witty JP, Jensen RA, Johnson AL. Expression and localization of Bcl-2 related proteins in human ovarian cancers. *Anticancer Res* 1998;**18**(2B):1223-30.
147. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;**156**(2):409-17.
148. Kaur TB, Shen T, Gaughan J, et al. Premalignant lesions in the contralateral ovary of women with unilateral ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;**93**(1):69-77.
149. Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herod J, et al. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene* 1995;**11**(7):1217-28.
150. Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K, et al. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1999;**35**(8):1214-9.
151. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998;**16**(8):2583-90.
152. Kupryjanczyk J, Szymanska T, Madry R, et al. Evaluation of clinical significance of TP53, BCL-2, BAX and MEK1 expression in 229 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimen. *Br J Cancer* 2003;**88**(6):848-54.
153. Berker B, Dunder I, Ensari A, Cengiz SD, Simsek E. Prognostic significance of apoptotic index and bcl-2 and p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;**23**(6):505-10.
154. Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DJ. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996;**56**(9):2178-84.
155. Marx D, Binder C, Meden H, et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997;**17**(3C):2233-40.
156. Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. *Br J Cancer* 1995;**72**(5):1324-9.

157. Diebold J, Baretton G, Felchner M, et al. bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996;**105**(3):341-9.
158. Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH, 2nd, Krajewska M, Reed JC. Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. *Clin Cancer Res* 1997;**3**(2):199-208.
159. Ozols RF, Schwartz PE, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001: 1597-1632.
160. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 1993;**329**(21):1550-9.
161. Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet* 2002;**360**(9332):505-15.
162. Pecorelli S, Benedet JL, Creasman WT, Shepherd JH. FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Int J Gynaecol Obstet* 1999;**65**(3):243-9.
163. Greene FL, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
164. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981;**47**(1):207-14.
165. Willingham MC, Bhalla K. Transient mitotic phase localization of bcl-2 oncoprotein in human carcinoma cells and its possible role in prevention of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1994;**42**(4):441-50.
166. Lu QL, Hanby AM, Nasser Hajibagheri MA, et al. Bcl-2 protein localizes to the chromosomes of mitotic nuclei and is correlated with the cell cycle in cultured epithelial cell lines. *J Cell Sci* 1994;**107 (Pt 2)**:363-71.
167. Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, et al. Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *J Biol Chem* 2002;**277**(36):33490-500.

168. Strobel T, Tai YT, Korsmeyer S, Cannistra SA. BAD partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 1998;**17**(19):2419-27.
169. Hieken TJ, Velasco JM. Selective or routine axillary disease staging for patients with clinically lymph node-negative breast cancer? *Surgery* 2006;**140**(4):500-7; discussion 507-8.
170. Psyrris A, Kountourakis P, Yu Z, et al. Analysis of p53 protein expression levels on ovarian cancer tissue microarray using automated quantitative analysis elucidates prognostic patient subsets. *Ann Oncol* 2007.
171. Bagnoli M, Balladore E, Luison E, et al. Sensitization of p53-mutated epithelial ovarian cancer to CD95-mediated apoptosis is synergistically induced by cisplatin pretreatment. *Mol Cancer Ther* 2007;**6**(2):762-72.
172. Gomes CP, Andrade LA. PTEN and p53 expression in primary ovarian carcinomas: immunohistochemical study and discussion of pathogenetic mechanisms. *Int J Gynecol Cancer* 2006;**16 Suppl 1**:254-8.
173. Sagarra RA, Andrade LA, Martinez EZ, Pinto GA, Syrjanen KJ, Derchain SF. P53 and Bcl-2 as prognostic predictors in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002;**12**(6):720-7.

3.7 Tabelas

Tabela 3.7.1 – Características das Pacientes (n=45)

Parâmetros clinicopatológicos	Número de pacientes	%
Idade	<i>Mediana</i> - 57 anos	(22 - 83 anos)
Estágio FIGO		
IIA	1	2
IIIA	1	2
IIIB	5	11
IIIC	25	55
IV	13	29
Tipo Histológico		
Endometrióide	4	9
Seroso	29	65
Mucinoso	2	4
Adeno SOE	10	22
Grau		
I	3	7
II	20	45
III	2	4
Não graduado	20	44

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria, SOE – Sem origem específica

Tabela 3.7.2 – Anticorpos utilizados da família Bcl2 e p53

Anticorpo	Nome	Fabricante	Diluição	Marcação celular
AntiBcl-2	Polyclonal rabbit anti/mouse Bcl-2	BD Biosciences Pharmingen	1:80	citoplasmática
Anti Bcl-x _L	Rabbit anti-Bcl-X Polyclonal Antibody W/Control	BD Biosciences Pharmingen	1:1000	citoplasmática
Anti-Bad	Mouse IgG2b/Clone 48/Pos control A431	BD Biosciences Pharmingen	1:1000	citoplasmática
Anti-Bax	Polyclonal Rabbit anti-mouse/rat Bax Antibody	BD Biosciences Pharmingen	1:400	citoplasmática
anti-p53	Purified Mouse anti-human p53 Monoclonal Antibody – isótipo mouse IgG1 / clone Pab 1801	BD Biosciences Pharmingen	1:1000	nuclear

Tabela 3.7.3 – Tratamento (n=45)

Tratamento	Número de pacientes	%
<u>Achado abertura cavidade</u>		
Doença limitada ovário	4	9
Doença limitada pelve	9	20
Doença abdome superior	11	24
Carcinomatose peritoneal	18	40
Dados perdidos	2	4
<u>Doença residual pós operatório</u>		
Carcinomatose/irressecável	12	27
< 2 cm	22	49
> 2 cm	10	22
Sem cirurgia	1	2
<u>Quimioterapia 1ª linha</u>		
Cisplatina/Paclitaxel	19	42
Carbo/Paclitaxel	14	31
Cisplatina/Ciclofosfamida	5	12
Carbo/Ciclofosfamida	1	2
Carboplatina	2	4.5
Tamoxifeno	1	2
Melfalan	1	2
Não	2	4.5
<u>Resposta inicial</u>		
Resposta Completa	25	55
Resp Parcial/D Estável	8	18
Progressão	3	7
Óbito	2	4
Abandono	3	7
Toxicidade impeditiva	1	2
Óbito pós op	3	7
<u>Número de ciclos</u>		
1	2	4
2	4	10
3	1	2
5	1	2
6	28	62
7	3	7
8	1	2
10	1	2
0	4	9

Tabela 3.7.4 - Resultados Imunohistoquímica (n=45)

Imunohistoquímica	Número de pacientes	%
Bcl-2		
positivo	22	49
negativo	23	51
Bcl-x_L		
positivo	36	80
negativo	9	20
Bax		
positivo	44	98
negativo	1	2
Bad		
positivo	39	87
negativo	6	13
p53		
positivo	26	58
negativo	19	42

Tabela 3.7.5 - Análise de resposta ao tratamento quimioterápico conforme expressão das proteínas em estudo

Proteínas	IHQ	Resposta ao tratamento quimioterápico de primeira linha				p
		Completa	Parcial/Estável	Progressão		
Bcl2	Negativo	13	3	2	<i>0.49</i>	
	Positivo	12	5	1		
Bcl-x_L	Negativo	6	2	1	<i>0.86</i>	
	Positivo	19	6	2		
Bax	Negativo	0	1	0	<i>0.44</i>	
	Positivo	25	7	3		
Bad	Negativo	3	1	1	<i>0.61</i>	
	Positivo	22	7	2		
p53	Negativo	10	5	2	<i>0.79</i>	
	Positivo	15	3	2		

IHQ - Imunohistoquímica

Tabela 3.7.6 - Análise de Sobrevida Livre de Doença conforme expressão das proteínas em estudo

Proteínas	IHQ	SLD mediana	IC 95%	(Log- rank) p
		<i>meses</i>		
Bcl2	Negativo	40	(9.7 - 70.2)	0.90
	Positivo	16	(0 - 53.2)	
Bcl-x_L	Negativo	16	(8.7 - 23.2)	0.29
	Positivo	40	(22.3 - 57.7)	
Bax	Negativo	58	-	0.86
	Positivo	35	(10,2 - 59.7)	
Bad	Negativo	47	(0 - 104)	0.66
	Positivo	40	(11.2 - 58.8)	
p53	Negativo	58	(39.8 - 76.2)	0.04
	Positivo	16	(6.2 - 25.8)	

IHQ – Imunohistoquímica, SLD – Sobrevida Livre de Doença
IC – Intervalo de Confiança

Tabela 3.7.7 - Análise de Sobrevida Geral conforme expressão das proteínas em estudo

Proteínas	IHQ	SG mediana	IC 95%	(Log- rank) <i>p</i>
		<i>meses</i>		
Bcl2	Negativo	40	(9.7 - 70.2)	0.83
	Positivo	16	(0 - 68.3)	
Bcl-x_L	Negativo	16	(8.8 - 23.2)	0.37
	Positivo	47	(26.4 - 67.6)	
Bax	Negativo	58	(2.9 - 67)	0.99
	Positivo	35		
Bad	Negativo	47	(0 - 14)	0.89
	Positivo	35	(6.3 - 63.6)	
p53	Negativo	58	(39.8 - 76.1)	0.15
	Positivo	16	(6.2 - 25.8)	

IHQ – Imunohistoquímica, SG – Sobrevida Geral, IC – Intervalo de Confiança

Tabela 3.7.8 – Estudos sobre a associação entre as proteínas da família Bcl-2, p53 e o Carcinoma Epitelial de Ovário

Autor	N	Bcl-2	Bax	Bcl-X _L	P53	
Berker ¹⁵³ † (Turquia)	50	50%	-	-	66%	Sem associação
Herod ¹⁵⁴ † (Reino Unido)	70	57%	-	-	61%	P53 associado com pior sobrevida Bcl-2 associado com melhor sobrevida
Mano ¹⁵⁰ † (Japão)	66	42%	-	-	45%	Bcl-2 associado com pior resposta e pior sobrevida
Baekelandt ⁷⁴ * (Noruega)	185	39%	66%	62%	49%	Bcl2 pos e p53 neg associados com melhor sobrevida Bcl2 e Bax, um deles neg e o outro pos associado com melhor sobrevida
Chan ¹⁴⁷ † (EUA)	46	33%	-	-	54%	Associação inversa entre a expressão de Bcl-2 e p53
Marx ¹⁵⁵ † (EUA)	215	30%	47%	-	-	Bcl-2 associado com bom prognóstico Bax associado com mau prognóstico
Henriksen ¹⁵⁶ † (Dinamarca)	50	48%	-	-	-	Associação inversa entre a expressão Bcl-2 e p53 Bcl-2 neg associado com menor sobrevida
Tai ¹⁵¹ * (EUA)	45	-	60%	-	-	Bax pos associado com maior resposta ao paclitaxel e maior SLD
Kupryajczyk ¹⁵² # (Polônia)	229	32%	43%	-	59%	Bax pos associado com RC Bax pos com p53 pos associados com maior SLD

Estudos prospectivos. † Estudos retrospectivos. SLD- Sobrevida Livre de Doença

RC – Resposta Completa.

Neg - negativo

Pos - positivo

3.8 Figuras

Registro CID – C56 no HCPA = 370 casos (lista fornecida SAME, comparada com listas cirurgias e registro de câncer HCPA)

Revisão 370 casos:

* 112 casos erroneamente classificados como Carcinoma Epitelial de Ovário:

- Teratomas = 11 casos
- Cistos ovarianos benignos = 84 casos
- Tumores Borderline = 17 casos

* 85 erros grosseiros de classificação ou listagem

* 42 casos sem prontuário localizado (após três revisões, repetidas no período de 2 anos)

131 pacientes consideradas para a coorte

86 exclusões

- 35 pacientes com tratamento esporádico no HCPA
- 49 pacientes sem material para IHQ:
 - 10 diagnósticos por Citopatológico (CP)
 - 04 casos sem anatomopatológico (AP) ou CP
 - 19 casos sem localização bloco de parafina
 - 04 casos com quimioterapia neoadjuvante
 - 10 pacientes negaram-se a receber qualquer tratamento
- 02 pacientes sem tratamento adjuvante por problemas mentais
- 02 pacientes tratadas com cirurgia não oncológica

→ 45 inclusões

Figura 3.8.1 – Fluxo de pacientes

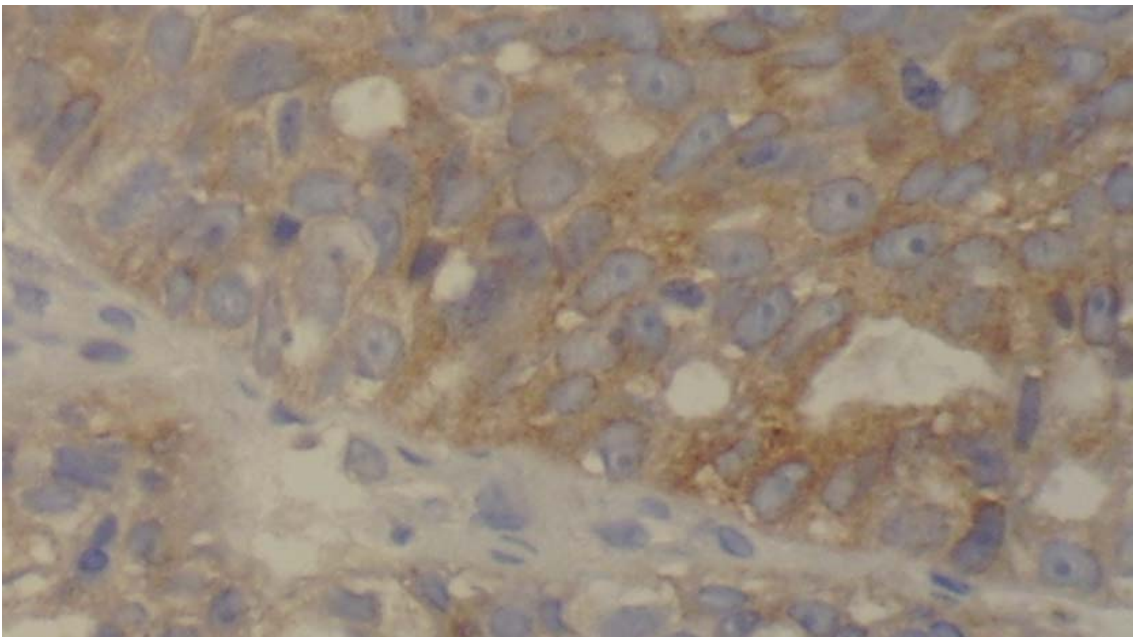
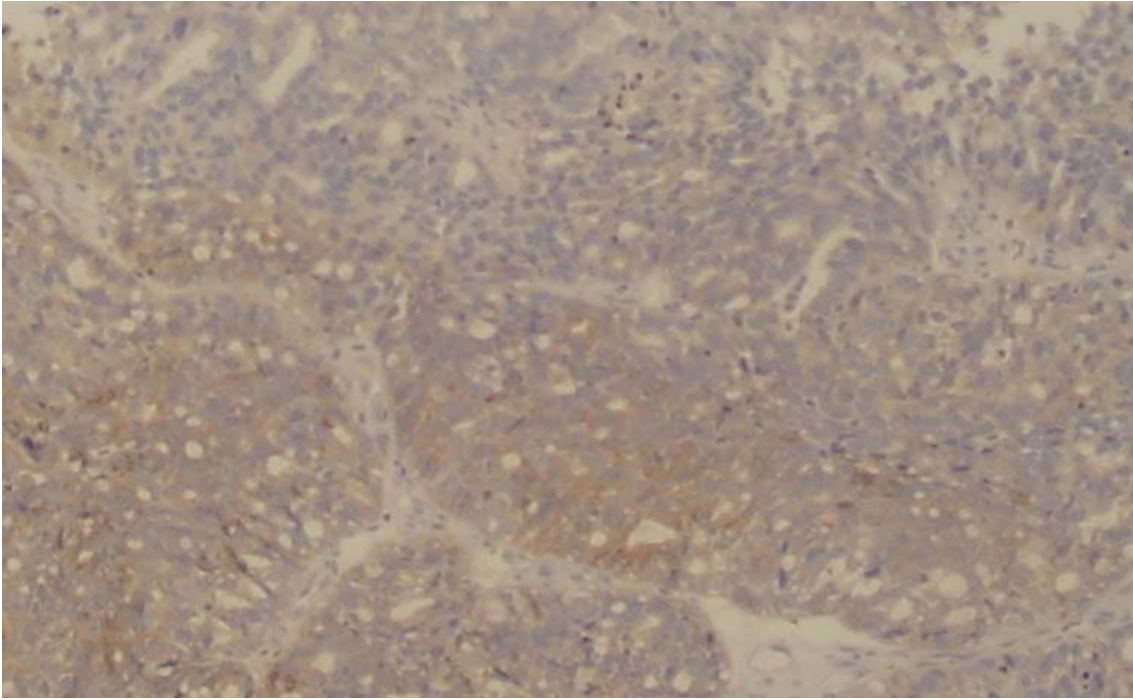


Figura 3.8.2 – Inmunohistoquímica positiva para Bcl2. (superior 100x, inferior 400x)

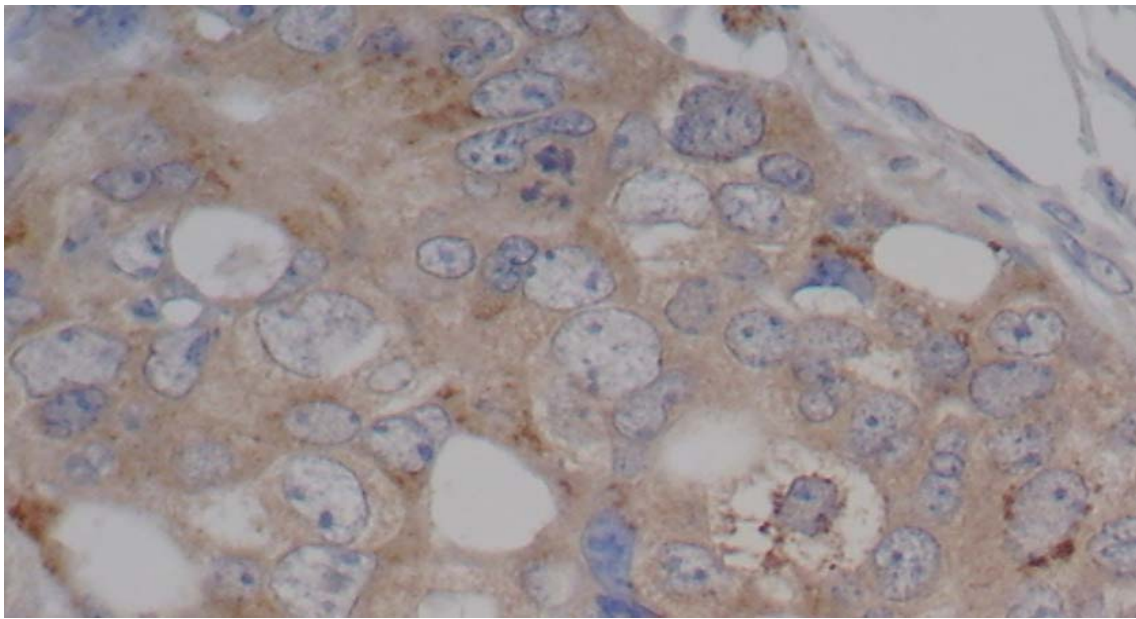
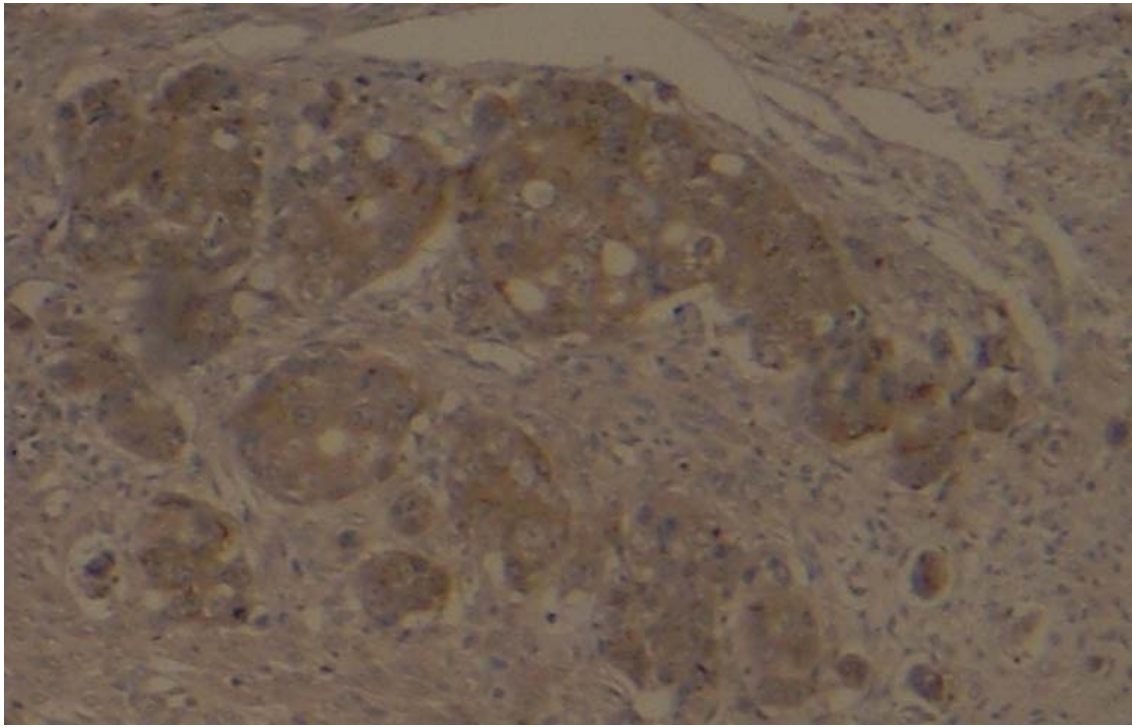


Figura 3.8.3 – Imunohistoquímica positiva para Bcl-x_L . (superior 100x, inferior 400x)

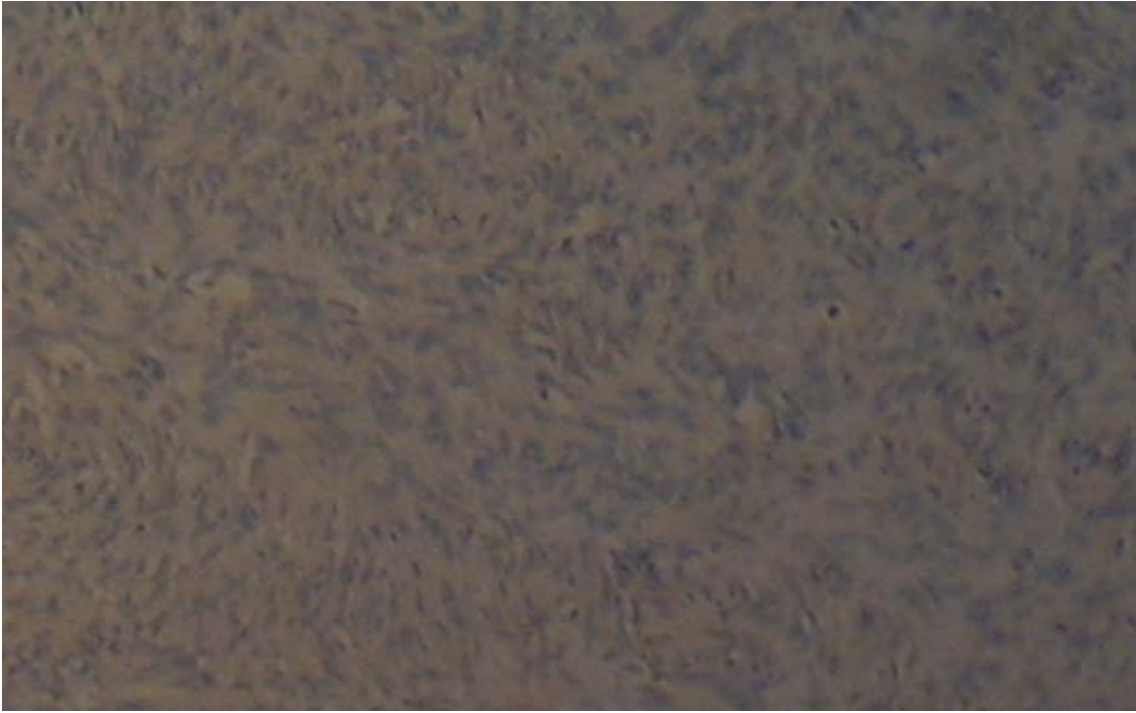


Figura 3.8.4 – Imunohistoquímica negativa para Bcl-x_L (100x)

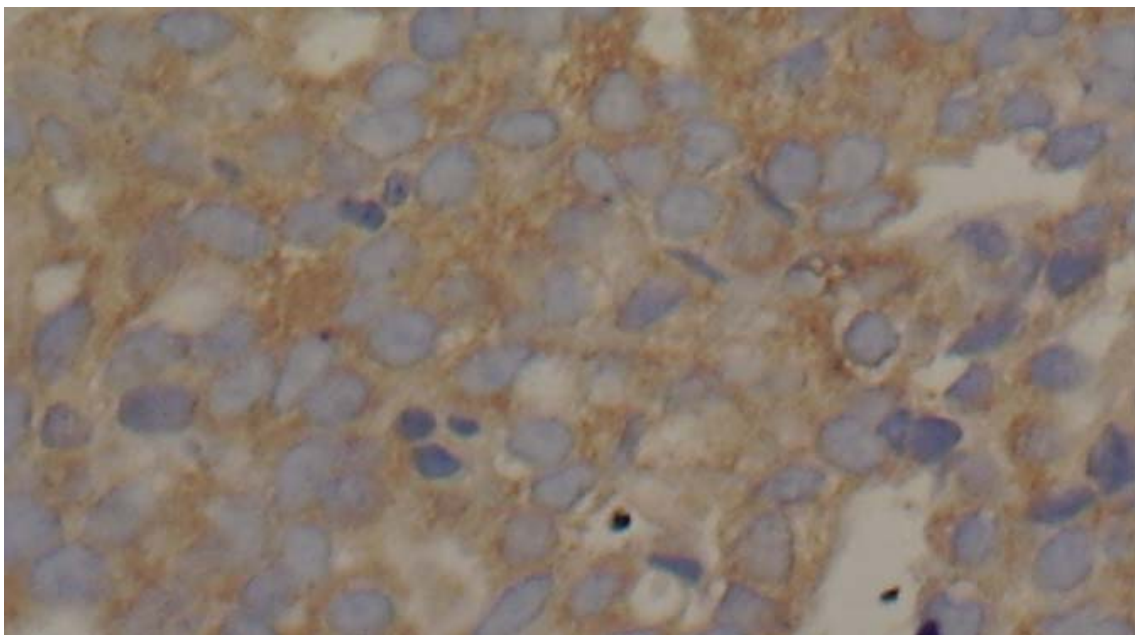
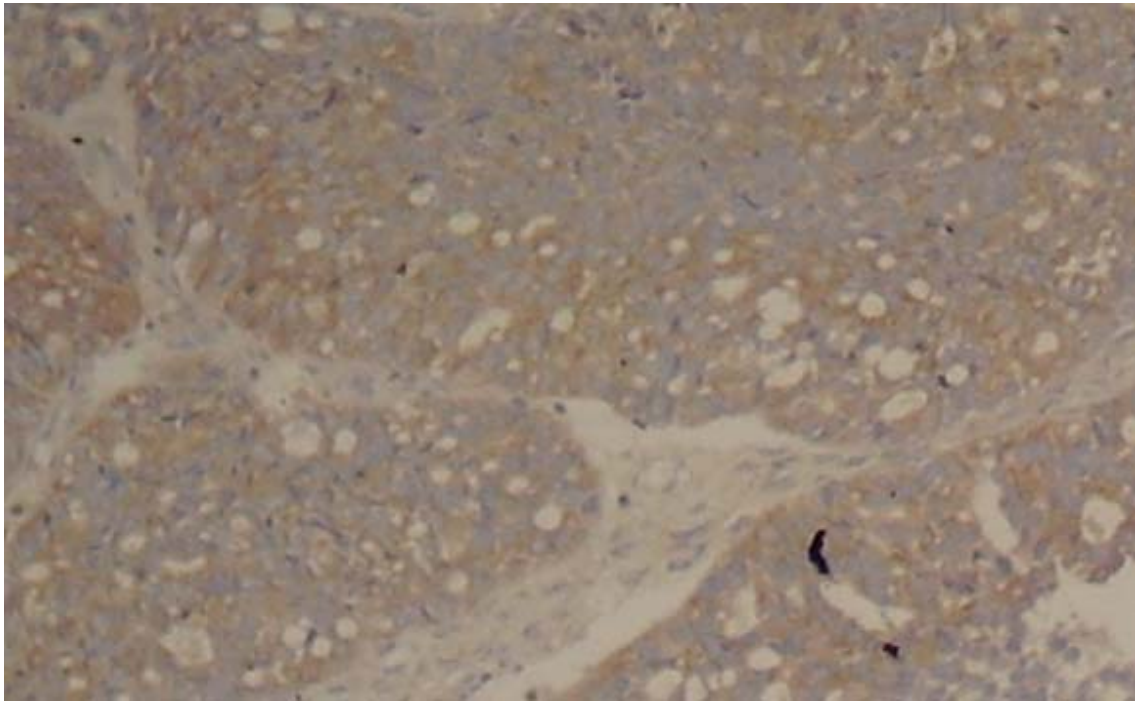


Figura 3.8.5 – Imunohistoquímica positiva para Bad. (superior 100x, inferior 400x)

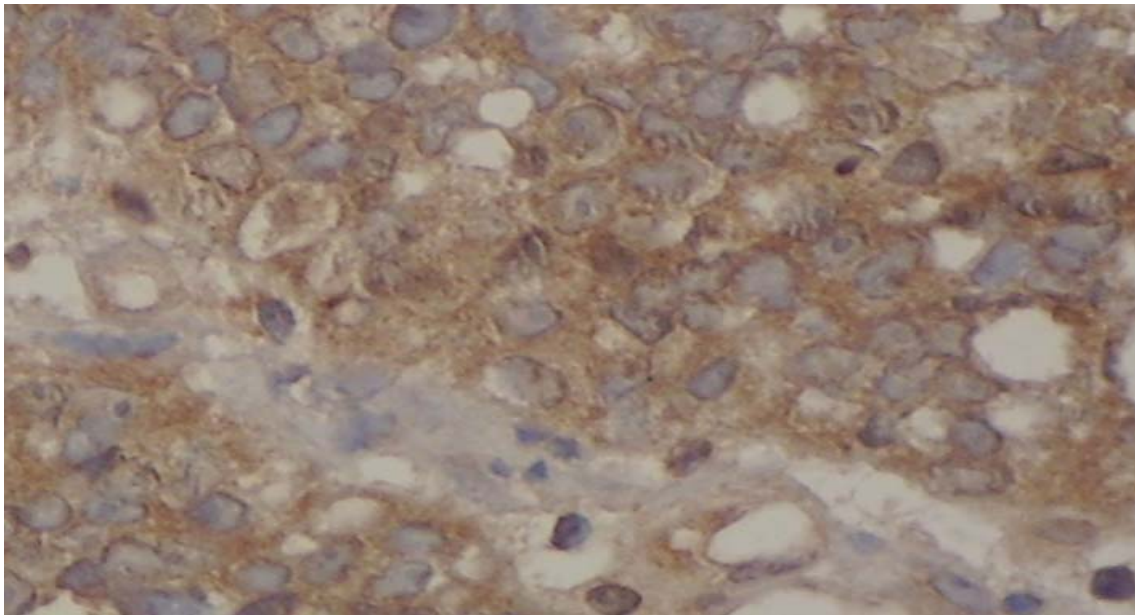
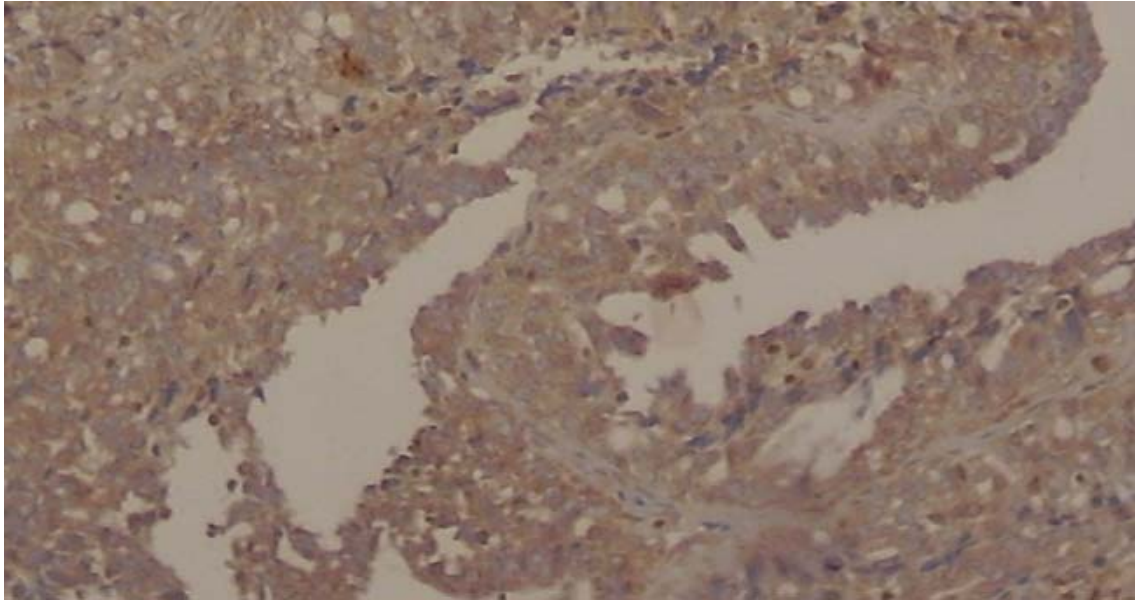


Figura 3.8.6 – Imunohistoquímica positiva para Bax. (superior 100x, inferior 400x)

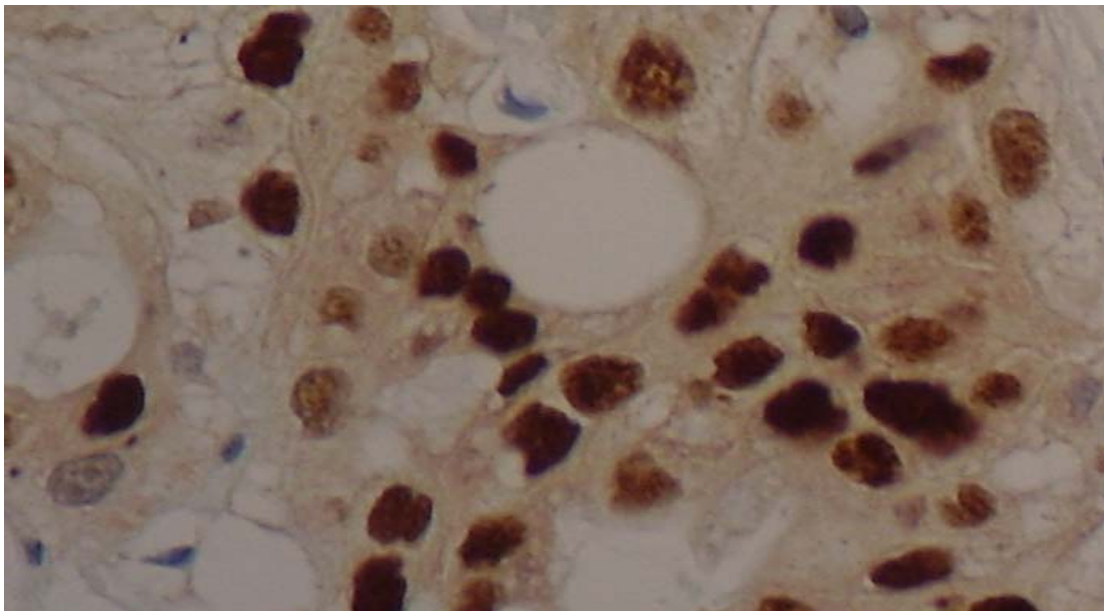
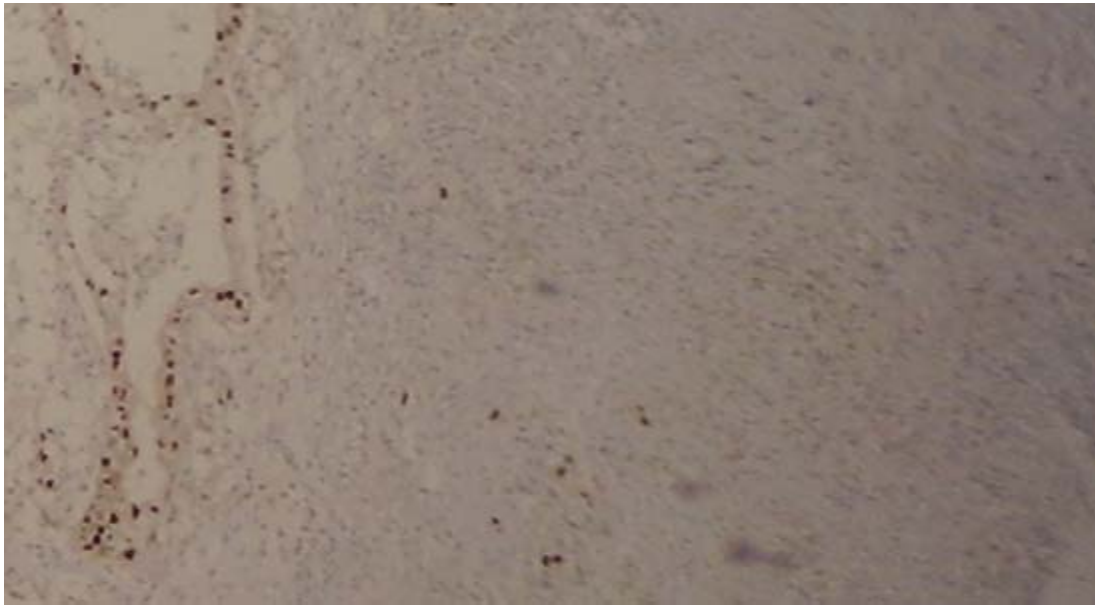


Figura 3.8.7 – inmunohistoquímica positiva para p53. (superior 40x, inferior 400x)

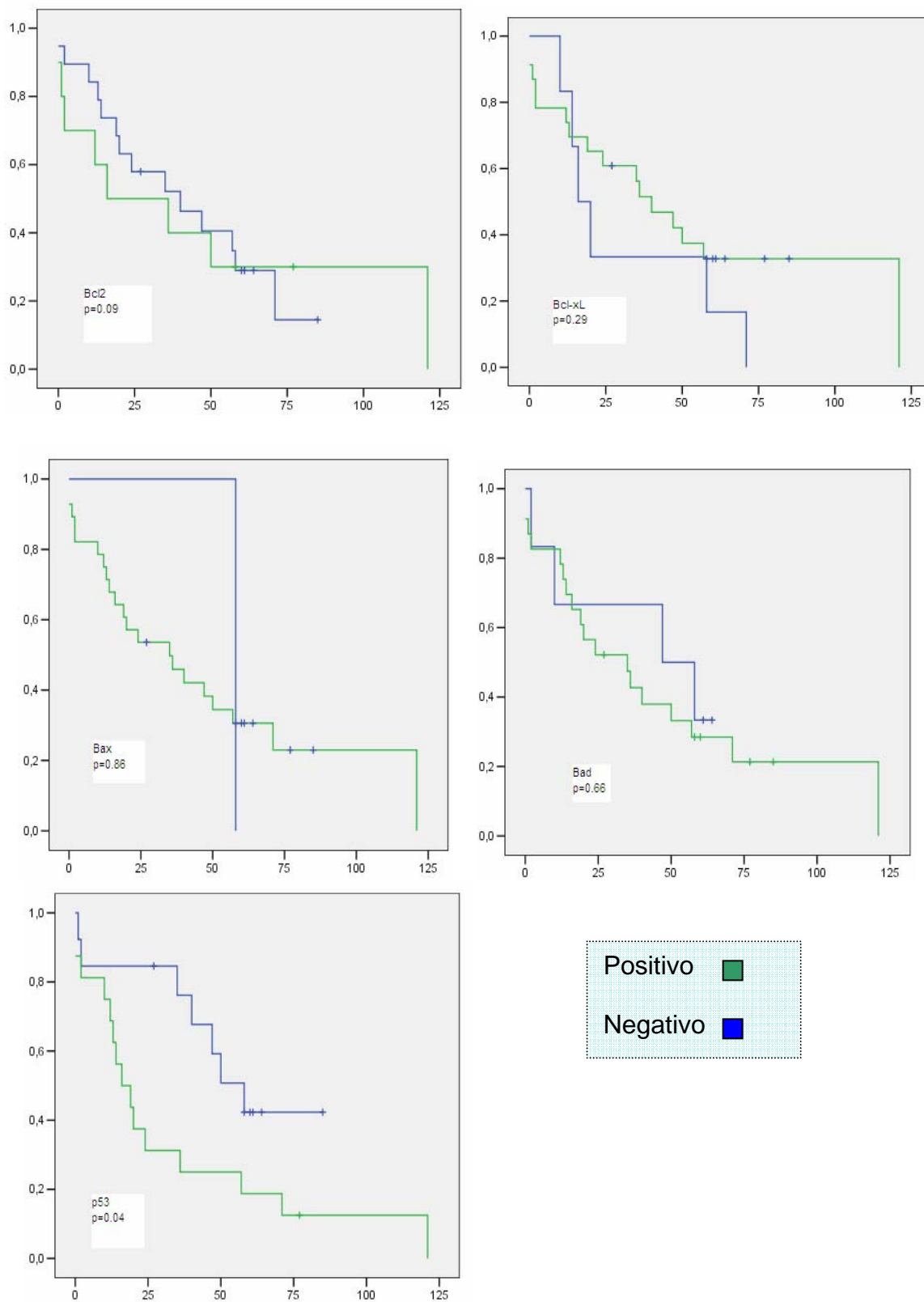


Figura 3.8.8 – Kaplan-Meier Bcl-2 / p53 e Sobrevida Livre de Doença.

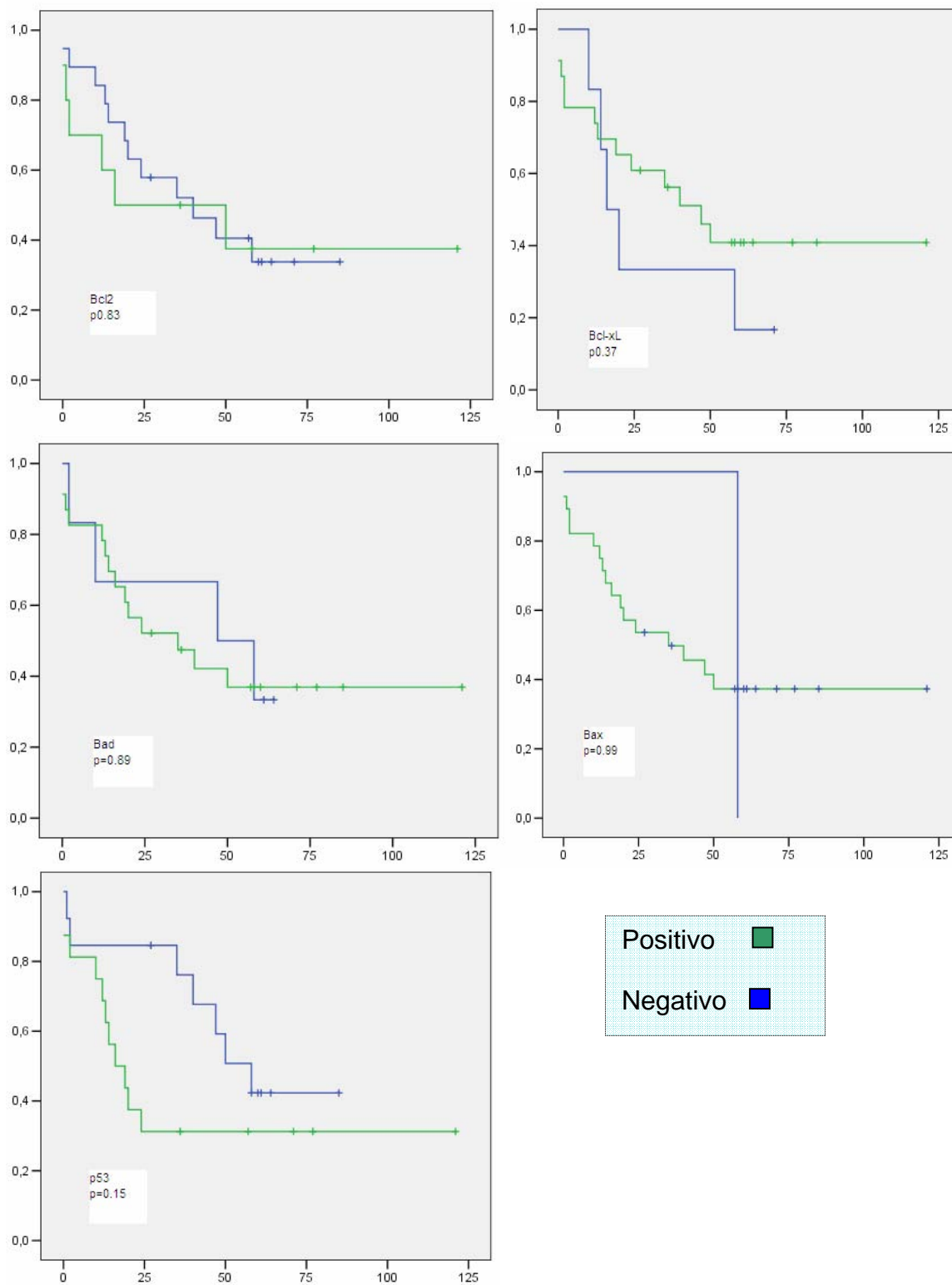


Figure 3.8.9 – Kaplan-Meier - Bcl2 / p53 e Sobrevida Geral.

4. Anexos

Carcinoma de Ovário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

PATOLOGIA

AVALIAÇÃO CLÍNICA

- 1) Suspeita clínica
- 2) Massa ovariana definida
- 3) Carcinoma de ovário recidivado

ESTADIAMENTO

- 1) Grupamento por estágio

TRATAMENTO

Quimioterapia

- 1) Estágios IA e IB de baixo grau
- 2) Estágios I de alto grau e IC
- 3) Avançado - estágios II, III e IV
- 4) Recidivado
- 5) Quimioterapia intraperitoneal

Radioterapia

RECOMENDAÇÃO:

- 1) Estágios IA e IB de baixo grau
- 2) Estágio I de alto grau ou IC ou células claras:
- 3) Estágio II e III com citorredução adequada
- 4) Estágio III com citorredução inadequada e estágio IV
- 5) Carcinoma de ovário recidivado ou doença residual após tratamento adjuvante:
 - 5.1) Recidivada sensível a compostos do platínio
 - 5.2) Doença residual ou recidivada resistente a compostos do platínio não exposta a paclitaxel
 - 5.3) Segunda recidiva resistente a compostos do platínio ou já expostos a paclitaxel

AVALIAÇÃO DE RESPOSTA

SEGUIMENTO

BIBLIOGRAFIA

INTRODUÇÃO

O câncer de ovário é, nos Estados Unidos, a quarta causa mais comum de mortalidade por câncer em mulheres e a principal causa de mortalidade de entre os tumores ginecológicos. Aproximada-

mente uma em cada setenta mulheres irá desenvolver câncer de ovário e aproximadamente 1% das mortes da população feminina resultam dessa doença. As maiores taxas de incidência ocorrem em países altamente industrializados, com exceção do

Japão, que possui uma das menores taxas do mundo. Estudos em populações migrantes sugerem fortemente influências ambientais na etiologia da doença. Nos Estados Unidos, a incidência varia desde 15,7 em cada 100.000 mulheres de 40 a 44 anos até 54 em cada 100.000 nas idades de 75 a 79 anos. Neste país, no ano de 1995, foram estimados 26.600 novos casos de câncer de ovário, representando 5% dos tumores malignos em mulheres e sendo a 4ª causa de morte por câncer. Durante o ano de 1991, em Porto Alegre, foram diagnosticados 62 casos de câncer de ovário, e ocorreram 38 óbitos pela doença. As neoplasias epiteliais de ovário se desenvolvem geralmente na população adulta caucasiana. Raramente ocorrem antes da menarca e a sua taxa de incidência aumenta significativamente após esta. Uma alta incidência de tumores epiteliais é encontrada em mulheres com poucas gestações, nulíparas e mulheres com história de infertilidade. Nenhuma associação clara entre câncer de ovário e a administração de estrógenos sintéticos está estabelecida, mas contraceptivos orais reduzem o risco da doença. O câncer de ovário e mama parecem compartilhar alguns fatores etiológicos, uma vez que mulheres com câncer de mama têm um risco 2 vezes maior que o esperado de desenvolver câncer de ovário, e mulheres com câncer de ovário têm uma incidência 3 a 4 vezes maior de câncer de mama. Embora incomuns, casos de câncer de ovário familiar podem constituir 5 a 10% do total de casos. Apesar de raro e comprometer 0,05% das pacientes com câncer de ovário, aquelas com duas ou mais parentes de primeiro grau com a doença têm um risco de 7% de apresentar a doença. Vários distúrbios genéticos, como a síndrome de Peutz-Jeghers e disgenesia gonadal, predispoem a neoplasias ovarianas, embora os tumores geralmente sejam benignos e de origem estromal. Não existe nenhum sinal ou sintoma específico do câncer de ovário, especialmente se a doença se encontra em estágios iniciais. Os sintomas podem incluir náusea, dispepsia e desconforto abdominal baixo. Pode ocorrer, menos comumente, sangramento vaginal e sintomas urinários. A dor abdominal pela massa ovariana é em geral intermitente e inespecífica, assim como o desconforto causado pela compressão da bexiga e reto. O diagnóstico de carcinoma de ovário é cirúrgico e necessita de confirmação histológica, mas nem todo aumento de volume ovariano é indicação de cirurgia. A ultrasonografia é importante para o diagnóstico diferencial nesses casos. A presença de tumor ovariano sólido ou misto indica cirurgia em qualquer faixa etária. Lesão ovariana cística é indicação de cirurgia em mulheres pós-meno-páusicas e pré-pubescentes, sendo necessário, no entanto, individualizar os ca-

sos. Lesão funcional com regressão espontânea podem surgir nessas faixas de idade. Nas mulheres em idade reprodutiva com tumores císticos anexiais menores que 6 a 10 cm podem ser manejados de forma expectante uma vez que 70% deles se resolverá sem cirurgia. Caso não tenham regredido após observação por quatro a oito semanas, tem indicação de exploração cirúrgica. Quando aparecem as manifestações clínicas, a doença se apresenta em estágio avançado. No momento do diagnóstico, 75% dos casos têm comprometimento tumoral além do ovário e 60% além da pelve. A disseminação dos tumores epiteliais ocorre por descamação superficial, por via linfática, ou menos comumente por metástases hematogênicas. Os tumores se disseminam por contiguidade e através do peritônio. Com a progressão da doença pode haver acometimento do ovário contralateral, implantes peritoneais e disseminação linfática para o útero e trompas de falópio. A superfície peritoneal da bexiga, retossigmoide, ou peritônio pélvico podem ser envolvidas por comprometimento direto. A forma mais comum de acometimento extraovariano é a disseminação celômica (transperitoneal). Os tumores podem exfoliar células mesmo sem haver ruptura da cápsula, estas se aderem à superfície peritoneal, formando micrometástases que continuam a exfoliar células tumorais. As células flutuam livremente e são removidas da cavidade peritoneal por canais linfáticos no diafragma. O fluxo do líquido peritoneal segue pelas goteiras parietocólicas, rumando predominantemente para o hemidiafragma direito. A drenagem ocorre para os capilares linfáticos submesoteliais do diafragma que intercomunicam-se com a superfície pleural e subsequentemente com os linfonodos mediastinais anteriores. A obstrução parcial ou completa dos linfáticos diafragmáticos pelas células tumorais permite a implantação tumoral no omento e em vários outros sítios da superfície serosa do peritônio, propiciando a formação de ascites carcinomatosas. A força da gravidade em posição ortostática leva à implantação precoce nos fundos de saco e ao longo da superfície do reto. Nessa rotina abordaremos os tumores epiteliais que são os tumores ovarianos mais prevalentes.

PATOLOGIA

Os tumores epiteliais correspondem a 85 a 90% dos tumores malignos ovarianos, e são classificados em benignos, malignos (isto é, invasivo) e de baixo potencial de malignidade (isto é, malignidade "borderline"). Os tumores de malignidade "borderline" têm diferente história natural em relação aos tumores benignos e malignos, pois progredem e metastatizam lentamente e devem, portan-

to, ser analisados separadamente dos tumores invasivos quanto ao plano de tratamento. Sua incidência pode chegar a 15% de todos os tumores epiteliais. Os tumores estromais correspondem a menos de 10% de todos os tumores ovarianos. São eles os tumores de células da teca-granulosa e de células de Sertoli-Leydig, que por produzirem estrogênio, podem estar associados com feminilização e puberdade precoce. Os tumores de células germinativas correspondem a menos de 5% de todas as neoplasias ovarianas com prognóstico e tratamento diferentes em relação aos tumores epiteliais. O grau de diferenciação celular (grau histológico) do câncer epitelial é um importante fator prognóstico independente, e ajuda a prever a sobrevida e a resposta ao tratamento (OMURA 1991). A gradação histológica dos tumores ovarianos não tem sido bem aceita pelos patologistas, principalmente por não existir uma classificação padrão objetiva e de fácil reprodução. Marcadores tumorais capazes de detectar câncer epitelial de ovário precocemente seriam de grande valor, uma vez que ainda hoje, a maior parte das pacientes são diagnosticadas já em estágios avançados da doença. O antígeno carcinoembrionário (CEA) encontra-se elevado em aproximadamente 58% dos pacientes com tumores ovarianos epiteliais estágio III. O CEA tem valor limitado no diagnóstico dos tumores ovarianos, uma vez que seus níveis séricos podem estar elevados em pacientes com cirrose, doença pulmonar crônica, doença inflamatória intestinal e em pacientes tabagistas. Para pacientes com elevação do CEA prévio ao tratamento, sua dosagem pode ser de valor para o acompanhamento de doença subclínica. O CA 125 parece ser o antígeno tumoral mais útil no diagnóstico e seguimento dos pacientes com câncer epitelial de ovário. Uma limitação do CA 125 como método de rastreamento é que apenas 50% das pacientes com câncer de ovário em estágios iniciais têm elevação de seus níveis. Das pacientes com carcinomas ovarianos epiteliais 82% apresentam este marcador. O aumento ou queda de seus títulos correlacionam-se com a doença em 93% dos pacientes. A elevação persistente de seus níveis em pacientes após cirurgia é quase invariavelmente associada à doença residual na cirurgia de reavaliação ("second-look"). A elevação dos níveis de CA 125 pode anteceder vários meses a detecção clínica da recidiva. Pacientes que completaram o tratamento primário e estão sendo seguidos devem dosar o CA 125 a cada 3 meses.

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Em toda mulher, particularmente peri ou pós-

menopáusia com sintomas abdominais ou pélvicos deve ser feito exame físico completo e exame pélvico, com especial atenção para a avaliação dos anexos.

1) Paciente com suspeita clínica de câncer de ovário deve realizar a seguinte avaliação:

- História e exame clínicos completos (incluindo pelve e papanicolao).
- Contagens hematológicas completas.
- Ecografia abdominal total e transvaginal
- Radiograma de tórax

2) Paciente com massa ovariana definida ou ascite deve, antes de ser levada a cirurgia, realizar os seguintes exames adicionais:

- Desempenho clínico
- CA 125

Observação: na presença de derrame pleural no radiograma de tórax ou ascite, deve ser realizada uma punção diagnóstica para obter pelo menos 10 ml de material para: exame citopatológico, citologia diferencial, LDH, proteínas totais, glicose, coloração de gram e cultural.

3) Paciente com câncer de ovário recidivado:

Estas pacientes devem, antes de iniciar tratamento de resgate, fazer os seguintes exames de estadiamento para ser definida a indicação de uma segunda citorredução:

- História e exame clínicos completos (incluindo pelve e papanicolao).
- Desempenho clínico.
- Radiograma de tórax
- Ecografia abdominal total
- Contagens hematológicas completas
- CA 125

ESTADIAMENTO

O estadiamento do câncer de ovário é baseado na extensão e localização da doença encontrada na exploração cirúrgica. É crucial que o procedimento cirúrgico inicial seja completo e preciso para o manejo adequado da paciente com câncer de ovário.

Tumor Primário

TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor limitado aos ovários
T1a	Tumor limitado a um ovário; cápsula intacta, sem tumor na superfície ovariana
T1b	Tumor limitado a ambos os ovários; cápsulas intactas, sem tumor na superfície ovariana

T1c	Tumor limitado a um ou ambos os ovários, com qualquer um dos seguintes achados: cápsula rompida, tumor na superfície ovariana, células malignas em ascite ou lavado peritoneal
T2	Tumor comprometendo um ou ambos os ovários, com extensão à pelvis
T2a	Extensão e/ ou implantes cm útero ou trompa (s)
T2b	Extensão a outros tecidos pélvicos
T2c	Extensão pélvica (2a ou 2b) com células malignas em ascite ou lavado peritoneal
T3	Tumor comprometendo um ou ambos os ovários, com metástase peritoneal microscopicamente confirmada, fora da pelvis, e/ou metástase em linfonodos regionais
T3a	Metástase peritoneal microscópica além da pelvis
T3b	Metástase peritoneal macroscópica além da pelvis, com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T3c	Metástase peritoneal além da pelvis, com mais de 2 cm em sua maior dimensão e/ou metástase em linfonodos regionais

Nota: As metástases da cápsula hepática são T3/estádio III, as metástases do parênquima hepático são M1/estádio IV. Derrame pleural deve ter citologia positiva para ser M1/estádio IV.

Linfonodos Regionais

NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em linfonodos regionais

Metástases à distância

MX	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Grupamento por estágio

Estádio IA	T1a	NO	MO
Estádio IB	T1b	NO	MO
Estádio IC	T1c	NO	MO
Estádio IIA	T2a	NO	MO
Estádio IIB	T2b	NO	MO
Estádio IIC	T2c	NO	MO
Estádio IIIa	T3a	NO	MO
Estádio IIIb	T3b	NO	MO
Estádio IIIC	T3c	NO	MO
	Qualquer T	N1	MO
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

TRATAMENTO

No câncer de ovário o tratamento é multidisciplinar onde a integração entre as diversas áreas envolvidas é fundamental.

Cirurgia

A cirurgia tem papel fundamental na abordagem diagnóstica e terapêutica da neoplasia ovariana. A confirmação diagnóstica é realizada através da laparotomia exploradora e após estudo histológico da lesão. Somente a suspeição clínica não é suficiente para a indicação de cirurgias amplas e radicais. Em centros médicos onde há disponibilidade do exame anátomo-patológico de congelação, o tratamento cirúrgico poderá ser executado no mesmo tempo do diagnóstico. Do contrário, deve-se aguardar o resultado do estudo em parafina de fragmento de biópsia ou da anexectomia e se houver confirmação da neoplasia, um segundo procedimento cirúrgico, agora com finalidade terapêutica, será indicado.

Constitui objetivo transoperatório, a avaliação da extensão intraabdominal da doença (estadiamento cirúrgico) e a ressecção tumoral ampla (Cirurgia de Citorredução ou de *debulking*).

A citorredução fundamenta-se nos princípios citocinéticos do ciclo celular neoplásico: quanto menor o volume tumoral, maior o potencial de cura ao tratamento adjuvante. Estudos clínicos confirmam taxas de sobrevida menores em pacientes com doença residual maciça. É considerada Cirurgia Citorredutora satisfatória aquela cujos nódulos tumorais residuais não ultrapassam, individualmente, um centímetro de diâmetro.

Com a finalidade de uniformizar a conduta cirúrgica e permitir o estadiamento correto, preconiza-se uma rotina de abordagem transoperatória:

1. Incisão mediana longitudinal com exposição ampla da cavidade abdominal;
2. Exame citopatológico do líquido de ascite ou do lavado peritoneal obtido com soro fisiológico nas regiões subdiafragmáticas, goteiras parietocólicas e fundo de saco anterior e posterior;
3. Retirada do tumor para exame histológico de congelação, se disponível;
4. Avaliação de toda a cavidade abdominal, para posterior registro do volume e localização de doença;
5. Histerectomia total extrafacial com salpingectomia bilateral;
6. Retirada de toda a massa tumoral visível; procurando não deixar doença residual maior que 1cm de diâmetro;
7. Linfadenectomia pélvica e paraaórtica;
8. Omentectomia infracólica;

9. Biópsias peritoneais aleatórias (fundo de saco anterior e posterior, goteiras parietocólicas e cúpulas subdiafragmáticas). É possível a detecção de doença oculta em 5 a 10% dos casos;

10. Descrição minuciosa dos achados cirúrgicos com localização e tamanho da doença residual.

Apesar do esforço cirúrgico ser direcionado à redução máxima do volume tumoral, existem dúvidas sobre as vantagens da citorredução em casos de envolvimento tumoral do sistema porto-hepático, dos linfonodos paraaórticos cefálicos aos vasos renais, do parênquima hepático, do pâncreas e comprometimento maciço do diafragma.

Para os casos de doença abdominal avançada com impossibilidade de ressecção cirúrgica radical em uma primeira abordagem, existem protocolos que preconizam, com o objetivo de redução tumoral, a realização de três ciclos de quimioterapia neo-adjuvante, seguidos de nova cirurgia (Cirurgia de Intervalo). Os resultados obtidos são controversos, mas a citorredução tem sido possível em pacientes com lesões estáveis ou que tenham apresentado uma resposta favorável após o terceiro ciclo de quimioterapia.

Nova cirurgia de citorredução poderá ser executada nos casos de recidiva ou persistência da doença. Pacientes jovens, com tumores bem diferenciados, com boa resposta ao tratamento primário e com intervalo livre de doença superior a 6 meses parecem ser favorecidas com esta abordagem.

Em situações clínicas especiais, existem estudos mostrando a possibilidade de cirurgia conservadora (salpingooforectomia unilateral com estadiamento cirúrgico da cavidade abdominal e biópsia do ovário contralateral). A responsabilidade de tal decisão deverá ser dividida com paciente e seus familiares devido ao risco potencial de progressão da doença.

Pré-requisitos para cirurgia conservadora:

1. Pacientes jovens com desejo de gestação;
2. Doença em estágio IA;
3. Tumor epitelial bem diferenciado ou *bordeline*, disgerminoma puro, tumor das células da granulosa ou das células de Sertoli-Leydig;
4. Seguimento pós-operatório regular e periódico.

Quimioterapia

1) Pacientes com câncer de ovário estágios IA e IB de baixo grau histológico

Como apenas 15% a 25% das pacientes são diagnosticadas nestes estágios, os estudos nesta

área estão limitados por um número reduzido de pacientes. Os estudos da década de 70 que compararam cirurgia com cirurgia seguida de quimioterapia e/ou radioterapia não mostraram aumento da sobrevida no grupo tratado de forma adjuvante (MAGUIRE 1993).

2) Pacientes com câncer de ovário estágios I de alto grau histológico e IC

Todas as pacientes com câncer de ovário de alto grau necessitam de tratamento adjuvante, bem como aquelas com carcinoma de células claras (NIH 1995). Muitas, mas não todas as pacientes com estágio IC devem fazer tratamento adjuvante (NIH 1995). Um estudo que comparou o fósforo-32 com melfalam não mostrou diferença no intervalo livre de doença e na sobrevida global, entretanto não houve grupo controle sem tratamento adjuvante (Young 1990). Estudos mais recentes comparam cisplatina ao fósforo-32, mas os resultados finais ainda não estão disponíveis (Maguire 1993). Devido ao bom prognóstico das pacientes com câncer de ovário inicial é necessário se desenvolver métodos para definir qual o grupo com maior risco de recidiva a fim de indicar tratamento adjuvante (Young 1990; Maguire 1993). O valor de tratamento adjuvante no câncer de ovário inicial ainda é incerto, e, em especial para as pacientes com estágio IA e IB, não deve ser oferecido (Maguire 1993).

3) Pacientes com câncer de ovário avançado - estágios II, III e IV

As pacientes com câncer de ovário com qualquer estágio diferente de I são consideradas doença avançada (NIH 1995). As pacientes com câncer de ovário submetidas a cirurgia citoredutora com resultado satisfatório (doença residual < 1 cm) ou não, tem indicação de tratamento havendo ainda controvérsias quanto a indicação da avaliação da resposta, fora de um estudo clínico, através de uma segunda laparotomia ("second look") (Maguire 1993). A literatura sugere que os programas com composto do platínum são superiores aos agentes alquilantes e a programas sem compostos do platínum (AOCTG 1991). Apesar disso o maior impacto dos compostos do platínum foi nos índices de resposta, com pouca diferença na sobrevida (AOCTG 1991; Maguire 1993). Alguns dos programas de tratamento do câncer de ovário avançado usam a doxorubicina associada a cisplatina. Ainda que alguns estudos mostrem vantagem de sobrevida com o uso da antraciclina, a maioria dos estudos randomizados que compararam programas com cisplatina, com ou sem doxorubicina, não mostraram benefício com o uso de doxorubicina

(Conte 1986; Neijt 1987; GICOG 1987; Omura 1989). Além disto, a doxorubicina torna o programa de tratamento mais tóxico (Ozols 1994), e pode levar a diminuição da dose da cisplatina que é a droga mais importante da combinação (Maguire 1993). A cisplatina foi, por algum tempo, o composto do platinum padrão para o tratamento do câncer de ovário. Com o surgimento da carboplatina, com um perfil de toxicidade aparentemente mais favorável, realizaram-se estudos visando estabelecer comparação com a cisplatina. Os estudos que comparam cisplatina com carboplatina, favorecem o uso da carboplatina devido a maior facilidade de administração e menor toxicidade renal e neurológica, embora a carboplatina cause maior mielossupressão, em especial trombocitopenia (TenBorkkel Huinink 1991; Edmonson 1989; Alberts 1992; Swenerton 1992; Hannigan 1993). A individualização da dose de carboplatina pelo uso da fórmula de Calvert (Calvert 1989), não usada nos estudos acima citados, pode acrescentar vantagem ao uso desta droga no lugar da cisplatina (Ozols 1994). Atualmente, há evidências de que a dose total dos compostos do platinum em um período definido de tempo é mais importante que a intensidade de dose (Maguire 1993; Ozols 1994; Aalberts & Garcia 1994). Devido ao seu perfil de toxicidade a carboplatina é a droga de escolha para os estudos que investigam altas doses de quimioterapia no câncer de ovário avançado (Ozols 1994; Albberts & Garcia 1994). O paclitaxel é, entre as novas drogas, a mais importante a ser acrescentada, na década de 90, ao tratamento do câncer de ovário (Ozols 1994; Caldas & Maguire 1995). Sua atividade significativa em pacientes com tumores de ovário refratários aos compostos do platinum, levaram ao seu rápido desenvolvimento nesta doença. Recentemente foi publicado um estudo randomizado comparando cisplatina e ciclofosfamida com paclitaxel e cisplatina em pacientes com câncer de ovário estágios III e IV sem tratamento prévio (Maguire 1996). Este estudo mostrou melhora dos índices de resposta objetiva, sobrevida mediana e intervalo livre de doença. Estudos adicionais definirão o papel da combinação paclitaxel e cisplatina no tratamento primário do câncer de ovário. Mais recentemente há estudos buscando desenvolver a combinação do paclitaxel com carboplatina (Ozols 1994; TenBorkkel Huinink 1995; Ozols 1995). Há ainda um estudo de fase I que está avaliando a combinação paclitaxel, cisplatina e ciclofosfamida com fator de crescimento hematopoiético apresentando 80% de respostas, mas ainda não há estudos adicionais com este regime de tratamento (Reed 1995). Os melhores re-

sultados no tratamento com quimioterapia para câncer de ovário pressupõe cirurgia citorrredutora satisfatória, com lesões residuais inferiores a 0,5 cm ou 1,0 cm (Ozols 1994). Um estudo recente (VanDerBurg 1995) randomizou, após 3 ciclos de cisplatina e ciclofosfamida, pacientes com citorredução inadequada para serem submetidas ou não a nova cirurgia citorrredutora, e receber mais 3 ciclos da mesma quimioterapia. Houve melhora do intervalo livre de doença e de sobrevida do grupo submetido a segunda cirurgia citorrredutora com sucesso.

4) Pacientes com câncer de ovário recidivado

No tratamento quimioterápico do câncer de ovário recidivado a primeira avaliação a ser feita é se estamos frente a doença refratária a compostos do platinum ou não. Doença clinicamente sensível a compostos do platinum é aquela que apresentou resposta inicial à quimioterapia com estes, e cujo intervalo do final do tratamento até a recidiva da doença é superior a 6 meses. Os pacientes que apresentaram progressão do tumor ou doença estável como melhor a resposta a quimioterapia com compostos do platinum são considerados resistentes a estes. Também se considera doença resistente ao platinum quando a recidiva ocorrer menos de 6 meses após o término do tratamento (Thigpen 1993). A literatura mostra que quanto maior o intervalo entre o primeiro e o segundo tratamentos com compostos do platinum, maiores serão os índices de resposta ao segundo tratamento, independente da droga usada na primeira e segunda linha (Thigpen 1993). As opções para doença resistente a compostos do platinum são basicamente o paclitaxel, a ifosfamida, a hexametilmelamina e o tamoxifen (Thigpen 1993; Ozols 1994). O paclitaxel é uma droga que demonstrou desde os estudos iniciais uma importante atividade em tumores de ovário refratários a platinum (Maguire & Rowinsky 1991; Thigpen 1993; Ozols 1994). Com respostas objetivas entre 20% e 29% em tumores refratários a compostos do platinum, o paclitaxel se tornou em uma opção muito para no tratamento do câncer de ovário recidivado pós-quimioterapia (Maguire & Rowinsky 1991) e motivou o seu estudo no tratamento primário desta doença (Maguire 1996). As principais toxicidades do paclitaxel são as reações alérgicas durante a infusão e a mielossupressão podendo ser necessário o uso de fator de crescimento hematopoiético conforme as doses e associações utilizadas (Ozols 1994). Uma segunda opção é a ifosfamida que mostrou índices de resposta, em pacientes refratários a compostos do platinum, entre 12% e 22%

(Thigpen 1993; Sutton 1993). Seu perfil de toxicidade inclui lesão do urotélio, mielossupressão e encefalopatia (Maguire & Rowinsky 1991). Apesar da modesta atividade, a ifosfamida tem papel no tratamento do câncer de ovário recidivado (Thigpen 1993). A combinação de paclitaxel com ifosfamida está em avaliação em estudo de fase I (Markman 1995). A hexametilmelamina é uma droga conhecida desde a década de 60 mas que ainda não tem papel definido no tratamento do câncer de ovário. Como sua toxicidade medular é modesta, é uma boa droga para ser usada em associação com outras drogas mielotóxicas (Maguire & Rowinsky 1991). Como tratamento de resgate a hexametilmelamina apresenta respostas em torno de 20% (Maguire & Rowinsky 1991; Thigpen 1993). Esta droga não é disponível no nosso meio. O tamoxifen, por sua vez, apresenta pelo menos um estudo como tratamento de segunda linha em câncer de ovário com índices de resposta de 18%. Seu uso de maneira mais intensa ainda depende de maiores estudos (Thigpen 1993).

5) Quimioterapia intraperitoneal

A quimioterapia intraperitoneal para o tratamento do câncer de ovário está baseado na possibilidade de expor o tumor a maiores concentrações das drogas superando a resistência a estas, aumentando a morte de células tumorais e melhorando o resultado do tratamento (Markman 1994). Os estudos iniciais mostravam ser possível atingir altas concentrações de citotóxicos na cavidade peritoneal com toxicidade sistêmica semelhante a observada com administração endovenosa. A importância disto no câncer de ovário uma vez que a disseminação da doença fica restrita a cavidade peritoneal até fases muito avançadas da doença (MARKMAN 1991). Por outro lado este método terapêutico só apresenta resultados satisfatórios quando o volume de doença a ser tratado é muito pequeno, microscópico ou menor de 0,5 cm (Markman 1991). De todas as drogas estudadas a cisplatina é a mais bem conhecida, mas também foram avaliadas a carboplatina, a mitoxantrona, a mitomicina e o paclitaxel (Markman 1991; Markman 1995). Recentemente foi publicado, na forma de resumo, um estudo que comparou a administração de ciclofosfamida com cisplatina endovenosa ou intraperitoneal (Alberts 1995). Houve maior sobrevida e menor toxicidade relacionada a cisplatina no grupo que usou esta por via intraperitoneal. Há algumas situações em que a quimioterapia intraperitoneal poderia ser considerada uma opção de tratamento: (1) após o tratamento sistêmico em pacientes com volume muito

pequeno de doença residual (< 0,5 cm); (2) tumores de alto grau em resposta completa definida por cirurgia; (3) tratamento inicial de doença estagios I e II (Markman 1991).

Radioterapia

A radioterapia tem, nos dias de hoje, um papel muito restrito no tratamento do câncer de ovário. Efeitos colaterais como bridas com obstrução intestinal e, às vezes, perfurações intestinais, não são incomuns com radioterapia para o abdômen, mas não ocorrem com quimioterapia. Além disto, trombocitopenia também é mais frequente nas pacientes tratadas com radioterapia abdominal total para câncer de ovário. A melhora do perfil de toxicidade da quimioterapia, com a introdução de programas de tratamento a base de compostos do platínio, fez com que a radioterapia fosse colocada em segundo plano (Lanciano & Randall 1991). Os estudos com radioterapia como tratamento adjuvante nos estágios iniciais do câncer de ovário mostraram resultados semelhantes aos obtidos com quimioterapia a base de compostos do platínio. Apesar disto, a maioria dos estudos são da década de 70 e início da década de 80 quando os estadiamento cirúrgico do câncer de ovário não era tão rigoroso e a técnica de radioterapia menos desenvolvida. O fósforo coloidal intracavitário (P32) que é um radioisótopo com alta energia e com maior penetração tecidual do que o ouro 198 (Au198) usado inicialmente e a ausência de radiação g do P32 diminuiu as complicações (Lanciano & Randall 1991). Um estudo randomizado recente comparou o P32 com melfalan no tratamento adjuvante dos estágios I e II de câncer de ovário com fatores de mau prognóstico, não havendo diferença de sobrevida nos dois grupos (Young 1990). Alguns autores usaram radioterapia por feixe externo associada ao P32, aumentando as complicações relacionadas ao tratamento e não havendo ganho de sobrevida (Lanciano & Randall 1991). Os trabalhos com radioterapia por feixe externo avaliaram a radioterapia abdominal total e a radioterapia pélvica. A radioterapia pélvica se mostrou inadequada como tratamento adjuvante no câncer de ovário devido ao alto índice de recorrência da doença fora do campo de irradiação (Lanciano & Randall 1991). A radioterapia abdominal total foi comparada de forma randomizada ao melfalan, não sendo demonstrado diferença de sobrevida, mas o braço da radioterapia apresentou alto índice de complicações tóxicas e um custo mais elevado (MDACC IN). Os estudos que compararam radioterapia com quimioterapia em pacientes com câncer de ovário avançado, também não mostraram

diferença de sobrevida. Assim como nos estudos com quimioterapia os pacientes que mais se beneficiam da radioterapia adjuvante são os com citorredução adequada (Lanciano & Randall 1991). Os estudos que avaliaram tanto P32 como a radioterapia ad tot em pacientes com doença persistente detectada na laparotomia de reavaliação após quimioterapia adjuvante, mostraram resultados favoráveis nas pacientes com doença microscópica ou lesões menores (Kuten 1988; Lanciano & Randall 1991). Os múltiplos tratamentos prévios com quimioterapia limitam o uso da radioterapia ad tot, assim como várias laparotomias dificultam tecnicamente o uso do P32. Além disto o P32 só tem atividade significativa em pacientes com doença microscópica e lesões menores que 3 a 4 mm. Concluindo, a radioterapia tem atividade significativa e comparável a quimioterapia, mas devido aos resultados de estudos que mostraram maiores índices de complicações com a radioterapia esta não faz parte do tratamento de rotina do câncer de ovário. Desde a realização destes estudos houveram melhoramentos na técnica da radioterapia e avanços tecnológicos, não havendo ainda relatos de estudos atuais que incorporem estes avanços (Lanciano & Randall 1991).

1) RECOMENDAÇÃO:

Cirurgia

Todas as pacientes com câncer de ovário, que apresentem condição clínica devem ser submetidas a cirurgia para estadiamento e citorredução da doença para lesões residuais inferiores a 1 cm.

2) Quimioterapia

2.1) Pacientes com câncer de ovário estágios IA e IB de baixo grau histológico:

Estas pacientes devem ser submetidas a tratamento cirúrgico conforme descrito acima, e, devido ao prognóstico favorável, serem colocadas em seguimento **sem** tratamento adjuvante.

2.2) Pacientes com câncer de ovário estagio I de alto grau histológico ou IC ou células claras:

Estas pacientes devem receber **3 ciclos** do programa de tratamento com **Cisplatina e Ciclofosfamida (PC)**, a cada 21 dias, **conforme Protocolo 24/99**.

2.3) Pacientes com câncer de ovário estágios II e III com citorredução adequada (tumores residuais menores que 1 cm):

Estas pacientes após cirurgia citorrredutora devem ser encaminhadas para tratamento com quimioterapia. O programa de tratamento, **admi-**

nistrado por 6 (seis) ciclos de Cisplatina e Ciclofosfamida (PC), a cada 21 dias, **conforme Protocolo 24/99**.

Estão em avaliação programas envolvendo Taxol e carboplatina. Há estudos mostrando a superioridade de PC, com a cisplatina administrada via intra-peritonal, podendo ser oferecido se o serviço dispuser de condições técnicas.

Observação:

- As pacientes sem evidência clínica e laboratorial de doença podem ser submetidas a cirurgia de reavaliação conforme rotina da instituição:

- sem evidência de doença: seguimento conforme descrito abaixo.

- com evidência de doença: paclitaxel conforme item 5.2, da seção de tratamento.

2.4) Pacientes com câncer de ovário estagio III com citorredução inadequada e estágio IV:

Estas pacientes após cirurgia citorrredutora sem sucesso devem ser encaminhadas para tratamento com quimioterapia.

- A resposta ao programa de tratamento deve ser reavaliada após o 3º ciclo. Aqui poderá ser considerada novamente a possibilidade de cirurgia citorrredutora. Aqueles pacientes que estiverem apresentando resposta objetiva ao tratamento, e não forem a cirurgia, devem seguir sendo reavaliados a cada dois ciclos. A quimioterapia será interrompida dois ciclos após resposta completa ou doença estável em duas avaliações consecutivas.

- Os casos submetidos a cirurgia no intervalo do tratamento com citorredução adequada seguem a mesma quimioterapia por mais 3 ciclos. Casos que ainda assim apresentam doença residual maior que 1 cm seguem o tratamento como as pacientes não submetidas a cirurgia.

- O programa de quimioterapia é **Cisplatina e Paclitaxel (PT)**, a cada 21 dias, **conforme Protocolo 25/99**. Está em estudo a combinação de Carboplatina e Taxol.

Observação: se for documentada toxicidade hematológica grau IV ou atraso do tratamento por mais de 7 dias a dose do paclitaxel deve ser reduzida para 135 mg/m².

2.5) Pacientes com câncer de ovário recidivado ou doença residual após tratamento adjuvante:

Toda paciente com recidiva de câncer de ovário ou **doença residual após quimioterapia** deve ser submetida, sempre que possível, a nova cirurgia

citorredutora visando doença residual inferior a 1 cm.

2.5.1) Doença recidivada sensível a compostos do platinum (ver definição item 3, seção de quimioterapia):

As pacientes que recidivaram 6 meses após o término do tratamento podem ser levadas a novo procedimento cirúrgico. Após, devem ser tratadas novamente com um programa de tratamento a base de compostos do platinum conforme descrito para pacientes com câncer de ovário nos item 2, 3 ou 4 da recomendação da tratamento.

2.5.2) Doença residual ou recidivada resistente a compostos do platinum não expostos a paclitaxel (ver definição item 3, seção de quimioterapia), devem receber Paclitaxel, a cada 21 dias protocolo 25/99.

2.5.3) Pacientes em segunda recidiva resistente a compostos do platinum ou já expostos a paclitaxel: - Tamoxifen 20 mg, via oral, 12/12h.

Observação: Devem ser estimulados programas experimentais a ser desenvolvidos de maneira conjunta após aprovação pela Comissão de Ética e Grupo de Pesquisa e Pós-graduação.

AVALIAÇÃO DE RESPOSTA

As pacientes em quimioterapia que possuam exames positivos (radiologia e CA-125) antes do início do tratamento devem ter estes mesmos exames repetidos a cada 2 ciclos. Além destes, devem ser realizados **a cada ciclo:**

- História e exame clínicos
- Contagens hematológicas completas.
- Provas de função renal
- Desempenho clínico

Na evidência de progressão da doença o tratamento deve ser interrompido e a paciente reavaliada conforme descrito acima no item C, da seção de avaliação clínica.

SEGUIMENTO

As pacientes fora de tratamento com quimioterapia devem avaliadas no ambulatório a cada 3 meses com a seguinte rotina de exames:

Exame	Periodicidade
1. História e exame clínicos	3 meses
2. Contagens hematológicas completas.	3 meses
3. Ecografia abdominal total e transvaginal	6 meses
4. Radiograma de tórax	6 meses
5. Desempenho clínico	3 meses
6. CA 125	3 meses
7. Fosfatase alcalina e g-GT	3 meses
8. Cintilografia óssea	se dor óssea ou elevação de fosfatase alcalina
9. Mamografia	anual

Se houver alteração do exame clínico antecipar os exames.

BIBLIOGRAFIA

- Advanced Ovarian Cancer Trialist Group (AOCTG). Br Med J 1991;303: 884.
- Alberts DS, et al. J Clin Oncol 1992; 10: 706.
- Alberts DS, et al. Proc Am Soc Clin Oncol 1995; 14: A760.
- Caldas C & Maguire WP. Semin Oncol 1993; 20: (suppl 3) 50.
- Calvert AH, et al. J Clin Oncol 1989; 7: 1748.
- Conte PF, et al. J Clin Oncol 1986; 6: 965.
- Edmonsosm JH, et al. J Nat Cancer Inst 1989; 81:1500.
- Gruppo Interegionale Cooperativo Oncologico Ginecologia. (GICOOG). Lancet 1987; 2: 353.
- Hoskins WI, et al. Semin Oncol 1991; 18: 213.
- Kuten A, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988; 14: 273.
- Lanciano RM & Randall M. Semin Oncol 1991; 18: 233.
- Maguire WP & Rowinsky EK. Semin Oncol 1991; 18: 255.
- Maguire WP, et al. N Engl J Med 1996; 328:1.
- Mangioni C, et al. J Nat Cancer Inst 1989; 89: 1464.
- Markman M, et al. Semin Oncol 1995; 22: (suppl 6) 84.
- Markman M. Semin Oncol 1995; 22: (suppl 6) 88.
- Neijt JP, et al. Eur J Cancer 1991; 27: 1367.
- NIH Consensus Development panel on ovarian cancer. JAMA 1995; 273:491.
- Omura GA, et al. J Clin Oncol 1989; 7:457.
- Omura GA, et al. J Clin Oncol 1991; 9: 1138.
- Ozols RF. Semin Oncol 1994; 21: (suppl 2) 1.
- Ozols RF. Semin Oncol 1995; 22: (suppl 6) 78.
- Reed E, et al. Semin Oncol 1995; 22: (suppl 6) 90.

Smith JP, et al. Natl Cancer Inst 1975; 42: 149. In:
Lanciano RM & Randall M. Semin Oncol 1991; 18: 233.
Sutton G. Gynecol Oncol 1993; 51:104.
Swenerton K, et al. J Clin Oncol 1992; 10: 718.
TenBorkkel Huinink W, et al. Proc Am Soc Clin
Oncol 1991; 10: A647.

TenBorkkel Huinink W, et al. Semin Oncol 1995;
22: (suppl 2) 97.
Thigpen JT, et al. Cancer 1993; 71: 1559.
VanDerBurg MEL, et al. N Engl J Med 1995; 332: 629.
VanHouwelingen JC, et al. J Clin Oncol 1989; 7: 769.
Young RC, et al. N Engl J Med 1990; 322: 1021

CARCINOMA DE OVÁRIO

Protocolo 24/99

Hidratação

- Orientação para o paciente: ingerir pelo menos 2 litros de líquidos nas 24 horas que antecedem o tratamento
- No hospital
 - Soro glicosado 5% - 1000ml
 - NaCl 20% - 40ml
 - KCl 10% - 10ml
 - MgSO₄ 50% - 3mlendovenoso em 2 horas
- Pré-medicação
 - Dexametasona 20mg IV, 30min antes da quimioterapia.
 - Ondansetron 8mg a 24mg, diluído em 50ml soro glicosado 5%, infundir em 15min, 30min antes da quimioterapia
- Quimioterapia
 - Ciclofosfamida 750mg/m², no D1, endovenoso em bolo;
 - Cisplatina 75mg/m², no D1, administrado em 2 horas diluído em:
 - soro fisiológico 0,9%, 900ml
 - manitol 20%, 100ml

Protocolo 25/99

Hidratação

- Orientação para o paciente:
 - Ingerir pelo menos 2 litros de líquidos nas 24 hora que antecedem o tratamento
- No hospital:
 - Soro glicosado 5% - 1000ml
 - NaCl 20% - 40ml
 - KCl 10% - 20ml
 - MgSO₄ 50% - 3mlendovenoso em 2 horas
- Pré-medicação
 - Ranitidina 50mg (ou Cimetidina 300mg) endovenoso diluído 30min antes da quimioterapia
 - Dexametasona 20mg endovenoso em bureta 30min antes da quimioterapia
 - Dexclorfeniramina 2mg, 2cp via oral, 30min antes da quimioterapia
 - Ondansetron 8mg a 24mg, diluído em 50ml soro glicosado 5%, infundir em 15min, 30min antes da quimioterapia
- Quimioterapia (nesta seqüência)
 - Paclitaxel 135-175 ug/m², D1, administrado em 1 a 3h, diluído em:
 - 500ml
 - Cisplatina 100mg/m², no D1, administrado em 2 horas diluído em:
 - soro fisiológico 0,9%, 500ml
 - monitol 20%, 100ml

Protocolo 26/99

- Pré-medicação
 - Ranitidina 50mg (ou Cimetidina 300mg) endovenoso diluído 30min antes da quimioterapia
 - Dexametosona 20mg endovenoso em bureta 30min antes da quimioterapia
 - Dexclorfeniramina 2mg, 2cp via oral, 30min antes da quimioterapia
 - Ondansetron 8mg a 24mg, diluído em 50ml soro glicosado 5%, infundir em 15min, 30min antes da quimioterapia
- Quimioterapia
 - Paclitaxel 135 a 200 mg/m², no D1, administrado em 3 horas diluído em:
 - soro fisiológico 0,9%, 500ml

Anexo 4.2 – Instrumento de coleta de dados clínicos

BANCO DE DADOS – PROJETO CÂNCER DE OVÁRIO		IDENTIFICAÇÃO & DEMOGRAFIA	
Data revisãoc: ___/___/___		Número caso: _____	
DADOS DEMOGRÁFICOS			
Iniciais da paciente: ___/___/___		Data Nascimento: ___/___/___	
Registro: _____		CA-125: _____ rgl/dL	
Outro: _____		AP: _____	
Data diagnóstico: ___/___/___		ESTÁGIO	
Idade no diagnóstico: _____		(1) I-A	
Diagnóstico por:		(2) I-B	
(1) citocg®, ONDE: _____		(3) I-C	
(2) biópsia, ONDE: _____		(4) II-A	
(3) cirurgia		(5) II-B	
(4) outro: _____		(6) II-C	
EXAMES PRÉ-OPERATORIOS		(7) III-A	
Tórax: (0) Negativo		(8) III-B	
(1) Positivo,		(9) III-C	
descriçãoc: _____		(10) IV, pleura	
_____		(11) V, outro: _____	
_____		(99) INDETERMINADO	
_____		ECOG	
_____		(0) ecog 0	
_____		(1) ecog 1	
_____		(2) ecog 2	
_____		(3) ecog 3	
_____		(4) ecog 4	
(0) Negativo		ASA	
(1) Positivo,		_____	
descriçãoc: _____		TEMPO INTERNACÃO: dias	
_____		_____	
_____		_____	
_____		_____	

BANCO DE DADOS - PROJETO CÂNCER DE OVÁRIO

CIRURGIA

LAPAROTOMIA
(0) NÃO
CIRURGIA (1) SIM

CITOREDUÇÃO
(1) PRIMÁRIA
(2) INTERVALO
(3) SECUNDÁRIA
(4) BIÓPSIA
(5) SECOND LOOK

Data cirurgia: ___/___/___

ACHADO ABERTURA CAVIDADE
(1) doença limitada ao ovário
(2) doença limitada a pelve
(3) doença em abdome sup
(4) carcinomatose peritoneal
(8) outro _____

PROCEDIMENTO CIRURGICO
(1) biópsias
(2) ooforectomia unilateral
(3) ooforectomia bilateral
(4) parhisterectomia
(5) linfadenectomia pélvica / paraaortica
(6) omentectomia
(7) ressecção cõlon
(8) ressecção trato urinário
(9) hepatectomia

(10) esplenectomia
(8) outro: _____

RESULTADO CIRURGIA
(1) NÃO ressecável
(2) Citoredução <2,0 cm
(3) Citoredução <2,0 cm, menos pleura
(4) Citoredução <2,0 cm, menos ligaco
(5) Citoredução , mas doença maciça abd sup,pelve
(6) Citoredução > 2,0 cm
(7) doença residual abc sup
(8) outro: _____

Drenagem torax ()
Drenagem abdome ()
Antibiótico profilático ()
Heparina ()
NPT ()
Transfusão ()

BANCO DE DADOS – PROJETO CÂNCER DE OVÁRIO

QUIMIO/SEGUIM

QUIMIOTERAPIA

QUIMIOTERAPIA ____* LINHA

- (1) primária
- (2) complementar

número de ciclos: ____/____/____
Data início: ____/____/____
Data conclusão: ____/____/____

PROTÓCOLO

- (1) Carboplatina + paclitaxel
- (2) Carboplatina
- (3) Paclitaxel
- (4) Cisplatina + paclitaxel
- (5) Cisplatina + ciclofosfamida
- (6) Cisplatina
- (7) Topotecan
- (8) Adriamicina
- (9) Etoposíde oral
- (10) Tamoxifeno
- (11) Outro: _____

RESPÓSTA FINAL

Data avaliação: ____/____/____

- (1) Completa
- (2) Parcial
- (3) Doença estável
- (4) Progressão
- (5) Recidiva
- (6) Óbito
- (7) Perda seguimento – Fone/Endereço

SEGUIMENTO

VISITA: ____/____/____

Date visita: ____/____/____

EM QUIMIOTERAPIA

- (0) NÃO

(1) SIM

EXAMES

Exame físico:

- (0) Negativo
- (1) Positivo, descrição: _____

Tórax: (0) Negativo

(1) Positivo, descrição: _____

Ecografia abdominal: (0) Negativo

(1) Positivo, descrição: _____

CA-125: _____ ng/dL

Outro: _____

(0) Negativo

(1) Positivo, descrição: _____

CONDICÃO

- (1) Completa
- (2) Parcial
- (3) Doença estável
- (4) Progressão
- (5) Recidiva
- (6) Óbito
- (7) Perda seguimento – Fone/Endereço

5. Artigo em inglês

**Bcl-2 Family Proteins Immunohistochemical Profile and Ovarian Cancer
Clinical Evolution: an Analysis of Patients from Hospital de Clínicas de Porto
Alegre / Brazil (1996 a 2004)**

Zimmer AS ^{*‡}, Meurer L ^{¶§}, Brunstein CG [†], Ilgenfritz R [§], Rivoire W ^Υ,

Edelweiss MI ^{*§}

* Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil;

‡ Medical Fellow, Breast Cancer Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Brussels, Belgium;

¶ Gastroenterology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil;

† Division of Hematology, Oncology and Transplant, University of Minnesota, Minneapolis, USA;

Υ Gynecology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil;

§ Pathology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

Corresponding author:

Alexandra dos Santos Zimmer

Rue Theodore De Cuyper, 129 / 26

1200 – Woluwe Saint Lambert, Brussels, Belgium

Phone: (32) 02 774 1092

alexandra.dossantoszimmer@eortc.be

5.1 Abstract

Background: In the USA, Europe and Canada epithelial ovarian cancer is the principal cause of death from gynecological cancer and most patients are diagnosed in advanced stages of the disease – Stages III or IV FIGO. The 5 years survival for these patients is around 30%. Treatment is based in laparoscopy to stage and debulk the tumor volume and most cases will need chemotherapeutic treatment, based on platinum compounds. Apoptosis route is involved in the tumor development and, probably in treatment resistance also. Bcl2 family proteins are active in the apoptosis route and its activity is divided in pro and anti-apoptosis pathways. Studies in ovarian cancer and Bcl2 proteins family activity were done in USA, Europe and Canada. However, the results remain controversial concerning the role of these proteins in ovarian cancer.

Objective: Determine Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad and p53 prevalence in a sample of patients from HCPA. Evaluate a possible correlation between these proteins expression and the clinical response, as well as the survival.

Methods and patients: Forty-five patients were retrospectively analyzed. They had epithelial ovarian carcinoma diagnosed and treated in a standardized way on HCPA, between the years 1996 to 2004. Tumor tissue samples were evaluated through immunohistochemical analysis to detect positive expression of the proteins Bcl2, Bcl-x_L, Bax, Bad and p53.

Results: The prevalence found for the studied proteins in this sample was: Bcl2 49%, Bcl-x_L 80%, Bax 98%, Bad 87% and p53 58%; similar to the levels described in the literature. Positive expression of p53 correlated with worst disease free survival (16 *versus* 58 months – p=0.04) in the univariate analysis. The other proteins did not show correlation with treatment response or with survival in this sample.

Conclusion: Prospective studies in this population, utilizing new technologies, as micro array, can be the best way to study this group of proteins. It seems to be the best way to study a group of proteins which shows a dynamic correlation between themselves, in an intrinsic network of pro and anti-apoptotic pathways.

5.2 Background

Epithelial ovarian cancer is the leading cause of death in gynecological cancers in developed world.^{1,2,4} In Brazil it is the third one, since uterine body and cervix tumors are still the first in this ranking.⁵

The peak of incidence is between the fourth and sixth decade of life, a phase of great productivity for most of the affected women. Unfortunately, the symptoms are diffuse and unspecific, delaying the diagnosis to advanced stages of the disease – stages III or IV – which, in fact, it is the reality observed in 70% of cases.^{4,7}

A multidisciplinary health care team should manage the ovarian cancer treatment. Surgeons well trained and used to the biology and dissemination pattern of this disease, usually can perform tumor resections in a more standardized way, which directly affects the patient's prognosis.¹³ The goal of surgical procedure is tumor debulking and staging of the disease, leaving the less tumor volume as possible in the abdominal cavity.^{40,159} Complementary treatment of ovarian carcinoma include chemotherapy based on platinum and taxanes compounds in most of the cases.^{60,159} In these patients, chemotherapy is able to extend the symptoms free survival and the overall survival in 18 o 38 months, respectively.^{52,160,161} But still, the overall survival in 5 years is just around 30%.⁴

Apoptosis, or programmed cell death, is important in the control of cell mutations and alterations, to avoid the tumor appearance.^{73,75} it is also important in the treatment of these tumors, since the cytotoxic chemotherapy, as the platinum derived compounds, will act based on this pathway.^{78,74}

The main regulators in the apoptosis process are the products of the tumoral suppressor gene p53 and from the gene Bcl2. The Bcl2 family is composed by pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins. The most known pro-apoptotic compounds are: Bax and Bad and the most known anti-apoptotic members are: Bcl-2 e Bcl-x_L.⁷⁴ Usually, the balance between the pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins activity will define the cell viability.⁷⁴

Evaluating specifically ovarian neoplasm, we can see that the Bcl2 family protein expression pattern is different between the normal ovarian tissue and the malignant ovarian tissue.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Bcl2 protein, for example, is present in the normal ovarian tissue more frequently than in the epithelial ovarian carcinomas^{144,145}, while Bax e Bcl-x_L have an opposite pattern.¹⁴⁴ Usually, a third of the epithelial ovarian carcinomas express the Bcl2 protein^{147,148} and, apparently, there is a correlation between Bcl2 expression and the evolution to the neoplasm pattern¹⁴⁷.

Previous studies in cell models of ovarian carcinomas suggest that the Bcl2 protein expression is associated also with platinum treatment resistant disease.¹⁴⁹ However, the expression pattern and the correlation between Bcl2 protein expression and ovarian carcinoma prognosis, in studies done in United States, Canada and Europe, is still a matter of debate.^{153,154 150 74 147 155 156 151 152}

The expression pattern of Bcl2 proteins family, favoring or preventing apoptosis, and its relation with chemotherapeutic treatment resistance can lead to a lower index of objective responses and, consequently, lower progression free survival. Demonstrating the association between worst clinical evolution and a lower index of objective responses to chemotherapy with alterations in the Bcl2 family protein expression could bring theoretical basis to future clinical trials about specific treatment targeting this metabolic route.

This study was developed with the aim of knowing the prevalence of the expression of Bcl-2, Bcl-x_L, Bax, Bad (Bcl-2 proteins) and p53 in ovarian carcinomas of a cohort of patients from the south of Brazil, which is a different population than the one evaluated until now, in the available studies. Besides that, we search for a link between the expression of these proteins and the effectiveness of the treatment,

5.3 Methods

Patients and Samples

This is an observational study of a historical (or retrospective) cohort, carried out in Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil. Patients with ovarian cancer, treated in this hospital from 1996 to 2004, constituted the sample. Since 1996, a protocol of standardized treatment was introduced in the hospital, aiming the cooperation between the Gynecological Oncology Unit and the Clinical Oncology Unit. (Attachment 4.1)

The patients were searched in the hospital's general register of patients and on the hospital register of cancer and surgery. The search was done based on the code C56 (CID-10). The selected patients should fulfill the following criteria: adequate surgical and clinical staging process, with collect of tumor tissue in the moment of diagnosis available for immunohistochemical analysis and with clinical data of treatment and follow-up available in the medical registers of the hospital.

After the initial search, 370 patients were localized. Their hospital registers were reviewed to complete the clinical data sheet of the study. (Attachment 4.2) Initially, 112 patients were censured because their diagnosis was not epithelial ovarian carcinoma, but, other kind of ovarian tumors (teratomas 11 cases, benign cysts 84 cases, borderline tumors 17 cases). Another 85 cases showed mistakes in the CID-10 classification or registration, not characterizing ovarian pathology at all; and 42 registers were not localized.

One hundred and thirty one samples were identified as epithelial ovarian carcinoma. Unfortunately, 84 of them did not reach the inclusion criteria of this study. Thirty-five patients had just part of their treatment at this hospital, which means, they had surgery or chemotherapy done in another hospital. Forty nine patients did not have available material for immunohistochemical analysis (10 cases were had diagnosed based only on cythopathologic studies, 04 cases did not have any anatomopathologic or histopathologic study, paraffin blocks were not localized in 19 cases, 04 cases were excluded because they received neoadjuvant treatment (which prevent appropriate immunohistochemical analysis) and 10 patients denied oncological treatment. Two cases received inadequate surgical treatment and another 02 cases did not receive adjuvant treatment because of serious mental problems. (Figure 5.8.1)

The studied sample consisted of 45 patients with median age of 57 years (variation between 22 and 38 years). Only one patient in this sample had not laparotomy at the beginning of the treatment. She was stage IV-FIGO at diagnosis, with abdominal cutaneous metastasis. She received initial treatment based on chemotherapy. The tissue sample analysed by immunohistochemical test was collected from the biopsy of the cutaneous lesion, before chemotherapy. General Characteristics of the sample population are on Table 4.7.1.

One pathologist (R.I.) without knowledge of the clinical data reviewed histologic slides. Clinical index – disease stage at diagnosis based on FIGO^{162,163} complete surgical debulking (less than 2 cm of residual tumor left in the abdominal cavity) or not, clinical response to treatment based on the criteria established by OMS¹⁶⁴ , progression free survival (in months) and overall survival (in months) were critically reviewed.

The follow up time was considered the time from diagnosis until the last information presented on clinical records or death.

Immunohistochemical

Sections from formalin-fixed, paraffin-embedded blocks were immunostained using the biotin-streptavidin-peroxidase method to study the Bcl2 family proteins expression. The antigen recuperation was induced in microwave oven using the diaminobenzidine chromogen.

Table 5.7.2 shows the details of antibodies and the dilutions used in this analysis. A sample of follicular lymphoma was the positive control and the negative controls were samples incubated without the primary antibody.

Three pathologists evaluated the immunohistochemical slides (M.I.A.E, L.M. e R.I.), unaware of the patients clinical status. Immunostaining was scored according to the percentage of positive staining of the tumor cells: 0 to 10% - negative; 11 to 25% - 1+; 26 to 50% - 2+; 51 to 75% - 3+; 76 to 100% - 4+. All the samples with more than 10% of immunostained cells were considered as positive, and the final score was composed by arithmetic media of the percentual results scored by each of the observers.

Statistical Analysis

A análise estatística foi realizada através da construção de tabelas de frequência. Differences in proportions were evaluated by the Chi-square (Mehta and

Patel, 1983) or Fisher's exact test, whichever was appropriate, and correlations were examined according to Pearson.

Disease-related and progression-free survival rates were calculated using the method of Kaplan-Meier (Kaplan and Meier, 1958). The log-rank test was used for univariate analysis, and a Cox proportional hazards regression model was used for multivariate evaluation of survival rates. In multivariate analysis, a backward stepwise selection procedure was done.(Cox, 1972).

The statistical significance was considered as two-sided $P \leq 0.05$. The Statistical Package for Social Science (SPSS - version 13.0 Chicago, Illinois) was used for statistical analysis.

Ethical Aspects

This study was approved by the Ethics Committee and GPPG HCPA-UFRGS.

5.4 Results

Clinicopathologic Correlations

The median age in this patient's cohort was 57 years, with a variance between 22 and 83 years. Most of these patients presented with advanced stages at the moment of diagnosis, 43 of them (95%) presented stages III or IV FIGO. (Table 5.7.1)

The most commonly observed histological group in this sample was serous adenocarcinoma, in 29 (65%) cases. No case of clear cells carcinoma was identified. This histological type is associated with the worst prognosis, together with the mucinous carcinoma. We grouped the histological types found in our sample as serous adenocarcinoma, endometrioid (4/45), mucinous (2/45) or non-specific adenocarcinoma (10/45). (Table 5.7.1)

Concerning the treatment, 44 patients were submitted to laparotomy for staging and treatment, one patient was diagnosed after biopsy of a metastatic lesion and received just chemotherapeutic treatment at diagnosis. Nineteen (42%) from the 45 patients presented volumous disease at diagnosis, with peritoneal carcinomatous dissemination or malignant cells in the upper abdomen at surgery. However, 22/44 patients (50%) achieved optimal debulking at surgery. (Table 5.7.3)

Two of the 45 patients did not receive adjuvant chemotherapy; because they died post-operatively (one death caused by intestinal occlusion and the other caused by pulmonary thromboembolism). From the 43 patients that received chemotherapy, the first line was based on platinum compounds in 40 patients (93%), associated to paclitaxel in 32 of these 40 cases (74%).

Clinical response to the first line chemotherapy treatment (base don image and serum CA125) was observed in 25/43 (58%) of the patients, while 8/43 (18%) showed partial response or stable disease, 3/43 (7%) showed progressive disease and 2/43 (4%) died during treatment, by disease progression. One patient (7%) in 43, abandoned the treatment and follow-up after the third cycle of first line chemoteray. (Tabela 5.7.3)

Evaluating advanced stage ovarian cancer established prognosis factors – age, performance status, histological type and grade, staging, ascites and debulking surgery results – and the response to first line chemotherapy, we did not find any significant statistical association in this patients' group.

From the 40 patients that received platinum compounds in the first line treatment, 39 had complete follow-up informations, 11 (25%) of them were considere as platinum resistant disease (tumor progression during platinum treatment application or recurrent disease before a 6 months interval from the end of platinum treatment). No significant association was found between the studied proteins and the presence of platinum tumoral resistance in this group.

Immunohistochemical

Twenty-two (49%) of the 45 cases presented positive expression of the Bcl2 protein. Most of the positive cases (20/22-90%) were graduated between 20 and 55% of positive cells in the sample. (Figure 5.8.2)

From the 45 analysed cases, 36 (80%) were positive to Bcl-x_L. Graduations were between 52 and 97% of positivity in 80% (29) of the 36 positive cases. (Figure 5.8.3 and 5.8.4)

Thirty-nine cases (39/45-87%) were positive to Bad. Twenty-six (67%) of this 39 cases were graduates between 26 and 75% of positivity to this protein in the tumoral cells samples. (Figure 5.8.5)

Forty-four from the 45 samples (98%) were positive to Bax, most of them (31/44-70%) with 75 to 100% of positivity. Only one case presented complete negative to reaction with Bax antibody. (Figure 5.8.6)

From the 45 cases, the p53 protein was expressed positively in twenty-six (58%). Eighteen of them (69%) had graduations between 75 and 100% of positive cells. (Figure 5.8.7 - Table 5.7.4)

Protein Bcl2 expression correlated positively with protein Bad (Pearson R = 0.378, p=0.011), as well as the proteins Bcl-x_L and Bax presented a regular positive correlation between themselves (Pearson R = 0.365, p=0.014). Bcl-x_L and p53 showed a weak negative correlation, without, however, reach statistical significance in this patient sample. (Pearson R = -0.126, p=0.41).

Examining possible associations between the expression of the studied proteins and known prognosis factors in advanced ovarian cancer (histological type and grade, age, surgical debulking and ascites), we found a correlation between the absence of immunostaining to p53 and the histological type serous adenocarcinoma. (p=0.01). Bcl2 family proteins did not show any significant association with the prognosis factors in this sample.

Aiming to investigate a possible predictive value of these proteins in ovarian carcinoma, correlations between proteic expression and the clinical response to the first line chemotherapy were tested. However, no significative correlation was found. Bcl-2 (Pearson R = -0.71, p=0.66); Bcl-xL (Pearson R = -0.135, p=0.375); Bad (Pearson R = 0.076, p=0.619); Bax (Pearson R = 0.018, p=0.9) e p53 (Pearson R = -0.173, p=0.25).

In the same way, no significative difference in the studied protein expression was demonstrated in the cases distribution between the groups with different responses to chemoterapic treatment. (Tabela 5.7.5)

Survival Analysis

The median survival observed was 24 months (minimum 0 and maximum 121 months, in the period of January 1st 1996 to December 31st, 2004. The observed 5-years survival was 18%.

At the end of follow-up period, 07 (16%) patients were disease free; recurrence or progression occurred in 22 (49%) patients, and 18 (40%) of this last group died during the observation period. Follow-up and death data were lost in 16 (36%) cases, form which we just have response to treatment complete data.

Analyzing disease free survival, using the Kaplan-Meier method, the Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bad protein expression, positive or negative, did not had significative influence in the difference between the patient groups in this sample. The negative expression of the p53 protein, otherwise, showed relation with longer free disease survival time, from 58 to 16 months. (Log rank, p=0.044). (Figure 5.9.8 – Table 5.7.5)

The multivariate analysis results on disease free survival, incorporating the known prognosis factors (age, histological grade and type, staging and surgical debulking), chemotherapy protocol and clinical response to treatment and the proteins studied, did not show any significant statistical association.

In terms of overall survival, we did not find association between the Bcl2 family proteins positive or negative expression, not even with the expression of protein p53 with survival in the Kaplan-Meier analysis. (Figure 5.9.9 – Table 5.7.6)

Considering the prognostic factors already known, the positive or negative proteins expression, the first line chemotherapy scheme, the response to this treatment, considered as complete or not; multivariate analysis did not reach any significant difference.

5.5 Discussion

According to our literature review, based on MEDLINE search, our study is the first one, out of USA, Europe or Canada, to evaluate the possible concomitant relationship between four different members of the Bcl2 family proteins, the p53 protein and epithelial ovarian carcinoma.

The population sample analyzed in this cohort confirmed the usual description we find on literature about the epithelial ovarian carcinoma^{2,4,5,9,27}, as we can see in the Tables 1 and 2. We can point out specially, the epidemiologic aspects commonly seen: middle age women, diagnosed in advanced stages of the disease and showing as predominant histological type the serous adenocarcinoma.

Comparing the prevalence of the expression of Bcl2 protein family and p53 protein described in the literature and the prevalence we found in our cohort (Tables 5.7.4 and 5.7.8), we can see the similarity. One should take into account that one reason that makes hard the results' comparison between all the studies about this subjects the different patterns for immunohistochemical test reading, the different techniques and reagents utilized, and the inter and intra-observer variability, that can happen in the use of immunohistochemical test in different centers. Even in the evaluation of Bcl2 protein, which use is common and well known in the diagnosis and prognosis of other pathologic entities, as the lymphomas, for example, the variation is broader.

In the epithelial ovarian cancer, the Bcl2 protein expression occurs in 40% (\pm 10%) of the cases described in previous works. Our cohort presented a 49% positivity. These results were superposed, even considering the different patterns

and reading scores, as the particular ones utilized in the series published by Baekelandt ⁷⁴ and Chan ¹⁴⁷, based in sum of scores obtained from the evaluation of the proportion of positive tumor cells and the intensity of this positivity. Mano and cols. ¹⁵⁰, differently, considered as positive just the nuclear expression of Bcl2 protein, following the rational that the connection of Bcl2 protein to the nuclear chromatin could inhibit the apoptosis. This inhibition of apoptosis could be linked to the chemotherapy resistance and worst prognosis. The protein positivity found in the Japanese work was 42% and this was the only work that correlated Bcl2 expression to a worst treatment response and worst survival. ^{165,166}

Protein Bcl-x_L is an anti-apoptotic protein with similar activity to Bcl-2. Its expression in epithelial ovarian carcinoma was evaluated before just by Baekelandt and cols. ⁷⁴, and they found 66% of positive immunostaining, using a reading score composed by addition of the extension and intensity of the immunostaining and the posterior division of the cases in three different groups. Our sample showed 80% of positive immunostaining and the reading was done considering as positive the samples with more than 10% of immunostaining. Then, the direct comparison between these two results is not possible.

Bax is described as having positive expression around 40% ^{152,155} or 60% ^{74,151} and was found in our patients with a prevalence of 98%. In the analysis performed by Tai and cols. ¹⁵¹ the positive expression of Bad was 60%, but only the samples with more than 50% of the cells immunostaining for the protein were counted as positive. Therefore, if a new analysis of their samples were done, utilizing more than 10% cells immunostaining as the cut-off point to define positivity, the prevalence of Bad expression could have been bigger. We repeated the analysis of our samples using more than 50% of immunostaining as cut-off point to positivity and

we found 70% of prevalence. All the statistical analysis was repeated with both criteria. The results, however, were not affected. Only one case in our sample presented no immunostaining to Bax, but the same case was negative to immunostaining for all the other tested proteins. Probably it happened because of inadequate fixation of the material, or absence of formalin tamponing process, scarceness or excess of time spent by the material in the fixing agent.

Previous studies (Table 5.7.8) found various associations of the Bcl2 family proteins and p53 protein between themselves, possibly, an expression of the anti- and pro-apoptotic interactions that happen with these proteins in the tumor context. In our population, Bcl2 protein expression correlated positively with Bad protein expression (Pearson R = 0.378, p=0.011) and Bcl-x_L with Bax (Pearson R = 0.365, p=0.014). Both interactions occurred between an anti-apoptotic and a pro-apoptotic protein, respectively.

In this context is interesting to think that Bad protein uses to make the negative regulation of the anti-apoptotic activity of the Bcl2 e Bcl-x_L proteins. This happens through the connection of Bad to Bcl2 and Bcl-x_L, specially this last one, and it leave the Bax protein free of a possible connection to Bcl-2 and Bcl-x_L⁸⁷, making easier to Bax it pro-apoptotic action on the mitochondrial membrane. None of the previously described works analyzed the presence of Bad protein in the context of epithelial ovarian carcinoma. However, the descriptions of its activity in the apoptosis process in ovarian tumor cell lines^{167,168}, establish the rational to describe Bad protein prevalence of the 87% in our population.

The p53 protein, recognized by its action as an apoptosis' regulator and its connection to the Bcl2 family proteins, is well known and has a disseminated utilization, with a better-standardized technique. The studies developed previously

presented a homogeneous prevalence, with expressions varying between 50 and 60%. In our sample the p53 protein prevalence was similar to that (58%). We also could confirm the association previously described between the positive expression of p53 and a worst disease free survival (from 16 to 58 months, $p=0.04$).^{74,154} There are descriptions, in breast cancer research, that the p53 wild type protein has a short half-life and, because of that, the immunohistochemical technique express, in fact, the accumulation of the p53 mutated protein.¹⁶⁹ Psyrrri and cols.¹⁷⁰ evaluated the p53 expression in ovarian carcinoma utilizing microarray technique, and could demonstrate an association with better disease free and overall survival in their model. Recent works with cell lines also are investigating response to platinum treatment and p53 mutation in ovarian carcinoma.¹⁷¹

Gomes and Andrade¹⁷² evaluated the immunohistochemical expression of the p53 protein in a Brazilian cohort of 70 patients and also found association between that expression and serous carcinoma histological type. In a previous work from the same group of researchers¹⁷³, with a cohort of 90 patients, the possible association between p53 protein and Bcl2 protein was studied, but no significative association was found. The prevalence they describe for these patients is of 47% for p53 protin and 20% for Bcl2 protein.

Treatment response, disease free survival and overall survival were not associated to different levels Bcl2 family proteins of p53 protein expression in our sample of patients.

Some evidence point to an association of better response to chemotherapy treatment with the agent paclitaxel and cases with a bigger expression of Bax protein.^{82,151} In our sample only one case did not expressed the Bax protein, and in the 44 cases positives, only one had a immunostaining percentage of cells of less

than 50%. This made difficult or impossible any comparison and conclusions. Also, any association between the studied proteins expression and platinum treatment resistance was found in this sample.

This study was done in a hospital of tertiary care. This hospital attends mostly patients of low social and low economic level, which is reflected here in high levels of follow-up losses and in small number of inclusions allowed. Part of the exposed problems, certainly are usual problems seen in a retrospective study. These aspects must be weighed in the evaluation of the data displayed here.

The dynamic relationships occurring in the regulation process of Bcl2 proteins family and p53 protein lead us to the conclusion that the immunohistochemical evaluation may not be the best way to evaluate their real role in the tumor environment and in the evaluation of cytotoxicity caused by drugs. In the immunohistochemical technique, we just have access to a limited number of interactions in a unique point in time. Advanced techniques, as microarray and proteomics, can detect real levels of active and/or mutated proteins, which would be better in the attempt of correlate it with clinical endpoints. Following the same line, multiple drug resistance studies can find answers in this intricated clinical scenario, probably not in a unique and specific factor.⁷⁴

Concluding, the Bcl2 proteins family and p53 protein patterns of expression found in this patients sample with epithelial ovarian cancer was similar to the previously described in the available literature around the world. The positive expression of the p53 protein showed correlation with less disease free survival in the univariate analysis. Investigations of the role of this protein, its mutations and its potential as a therapeutic target in the ovary cancer are already in investigation. The Bcl2 proteins family did not correlate to treatment response of survival in this sample.

Prospective studies, with the use of new technology for the detection of these proteins in ovarian cancer should be done to evaluate these questions.

5.6 Bibliography

1. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: an overview of randomised clinical trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. *Bmj* 1991;**303**(6807):884-93.
2. Colombo N, Van Gorp T, Parma G, et al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;**60**(2):159-79.
3. 1. Jemal A SR, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;**56**(2):106-30., 1991;**303**(6807):884-93. CiaocaoorctAOCTGB, 3. Colombo N VGT, Parma G, et al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;**60**(2):159-79., et al. Statistics for 2007, 2007.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;**56**(2):106-30.
5. Câncer I-INd. Estimativas de Incidência e Mortalidade para o Brasil, 1999.
6. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;**19**(1):3-10.
7. Karlan BY MM, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: Lippincott WW, ed. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, 2005.
8. Scully RE YR, Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. Washington. DC, 1998.
9. Scully R. Histological typing of ovarian tumors. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
10. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;**351**(24):2519-29.
11. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983;**309**(15):883-7.
12. Miralles C, Orea M, Espana P, et al. Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies. *Ann Surg Oncol* 2003;**10**(2):150-4.
13. Mayer AR, Chambers SK, Graves E, et al. Ovarian cancer staging: does it require a gynecologic oncologist? *Gynecol Oncol* 1992;**47**(2):223-7.
14. Zanetta G, Rota S, Chiari S, et al. The accuracy of staging: an important prognostic determinator in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. *Ann Oncol* 1998;**9**(10):1097-101.

15. Young RC, Decker DG, Wharton JT, et al. Staging laparotomy in early ovarian cancer. *Jama* 1983;**250**(22):3072-6.
16. Shepherd JH. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;**96**(8):889-92.
17. Sobin LH, Wittekind C, International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss., 2002.
18. Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K. Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1990;**75**(2):263-73.
19. Ahmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP, et al. Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1996;**14**(11):2968-75.
20. Bertelsen K, Holund B, Andersen JE, Nielsen K, Stroyer I, Ladehoff P. Prognostic factors and adjuvant treatment in early epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1993;**3**(4):211-218.
21. Finn CB, Luesley DM, Buxton EJ, et al. Is stage I epithelial ovarian cancer overtreated both surgically and systemically? Results of a five-year cancer registry review. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;**99**(1):54-8.
22. Sevelde P, Vavra N, Schemper M, Salzer H. Prognostic factors for survival in stage I epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1990;**65**(10):2349-52.
23. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991;**9**(7):1138-50.
24. van Houwelingen JC, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, van Oosterom AT, Neijt JP. Predictability of the survival of patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1989;**7**(6):769-73.
25. Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, et al. Long-term survival in ovarian cancer. Mature data from The Netherlands Joint Study Group for Ovarian Cancer. *Eur J Cancer* 1991;**27**(11):1367-72.
26. Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT, Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1992;**47**(2):159-66.
27. Thigpen T, Brady MF, Omura GA, et al. Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 1993;**71**(2 Suppl):606-14.

28. Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1983;**61**(4):413-20.
29. Heintz AP, Hacker NF, Berek JS, Rose TP, Munoz AK, Lagasse LD. Cytoreductive surgery in ovarian carcinoma: feasibility and morbidity. *Obstet Gynecol* 1986;**67**(6):783-8.
30. Heintz AP, Van Oosterom AT, Trimbos JB, Schaberg A, Van der Velde EA, Nooy M. The treatment of advanced ovarian carcinoma (I): clinical variables associated with prognosis. *Gynecol Oncol* 1988;**30**(3):347-58.
31. Potter ME, Partridge EE, Hatch KD, Soong SJ, Austin JM, Shingleton HM. Primary surgical therapy of ovarian cancer: how much and when. *Gynecol Oncol* 1991;**40**(3):195-200.
32. Redman JR, Petroni GR, Saigo PE, Geller NL, Hakes TB. Prognostic factors in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1986;**4**(4):515-23.
33. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 2003;**95**(2):113-25.
34. Aure JC, Hoeg K, Kolstad P. Clinical and histologic studies of ovarian carcinoma. Long-term follow-up of 990 cases. *Obstet Gynecol* 1971;**37**(1):1-9.
35. Griffiths CT, Fuller AF. Intensive surgical and chemotherapeutic management of advanced ovarian cancer. *Surg Clin North Am* 1978;**58**(1):131-42.
36. Berek JS, Trope C, Vergote I. Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer. *Ann Oncol* 1999;**10 Suppl 1**:3-7.
37. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002;**20**(5):1248-59.
38. Eisenkop SM, Nalick RH, Wang HJ, Teng NN. Peritoneal implant elimination during cytoreductive surgery for ovarian cancer: impact on survival. *Gynecol Oncol* 1993;**51**(2):224-9.
39. van Dam PA, Tjalma W, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P. Ultraradical debulking of epithelial ovarian cancer with the ultrasonic surgical aspirator: a prospective randomized trial. *Am J Obstet Gynecol* 1996;**174**(3):943-50.
40. Berek JS, Bertelsen K, du Bois A, et al. Advanced epithelial ovarian cancer: 1998 consensus statements. *Ann Oncol* 1999;**10 Suppl 1**:87-92.

41. van der Burg ME, van Lent M, Buyse M, et al. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med* 1995;**332**(10):629-34.
42. Rose PG NS, Brady M, et al. A phase III randomized study of interval secondary cytoreduction in patients with advanced stage ovarian carcinoma with suboptimal residual disease: a Gynecologic Oncology Group study. ASCO 2002: 201a.
43. Rahaman J, Dottino P, Jennings TS, Holland J, Cohen CJ. The second-look operation improves survival in suboptimally debulked stage III ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* 2005;**15**(1):19-25.
44. Gadducci A, Iaconi P, Fanucchi A, Cosio S, Teti G, Genazzani AR. Surgical cytoreduction during second-look laparotomy in patients with advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000;**20**(3B):1959-64.
45. Recchia F, De Filippis S, Rosselli M, Saggio G, Carta G, Rea S. Primary chemotherapy in stage IV ovarian cancer. A prospective phase II study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001;**22**(4):287-91.
46. Mazzeo F, Berliere M, Kerger J, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery and adjuvant chemotherapy in patients with primarily unresectable, advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003;**90**(1):163-9.
47. Vergote I, van Gorp T, Amant F, Neven P, Berteloot P. Neoadjuvant chemotherapy for ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)* 2005;**19**(12):1615-22; discussion 1623-30.
48. Berek JS, Hacker NF, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Survival of patients following secondary cytoreductive surgery in ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1983;**61**(2):189-93.
49. Williams CJ, Mead GM, Macbeth FR, et al. Cisplatin combination chemotherapy versus chlorambucil in advanced ovarian carcinoma: mature results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 1985;**3**(11):1455-62.
50. Neijt JP, ten Bokkel Huinink WW, van der Burg ME, et al. Randomised trial comparing two combination chemotherapy regimens (Hexa-CAF vs CHAP-5) in advanced ovarian carcinoma. *Lancet* 1984;**2**(8403):594-600.
51. Omura G, Blessing JA, Ehrlich CE, et al. A randomized trial of cyclophosphamide and doxorubicin with or without cisplatin in advanced ovarian carcinoma. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 1986;**57**(9):1725-30.
52. ICON2: randomised trial of single-agent carboplatin against three-drug combination of CAP (cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin) in women

- with ovarian cancer. ICON Collaborators. International Collaborative Ovarian Neoplasm Study. *Lancet* 1998;**352**(9140):1571-6.
53. Muggia FM, Braly PS, Brady MF, et al. Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2000;**18**(1):106-15.
 54. Thigpen JT, Blessing JA, Vance RB, Lambuth BW. Chemotherapy in ovarian carcinoma: present role and future prospects. *Semin Oncol* 1989;**16**(4 Suppl 6):58-65.
 55. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989;**111**(4):273-9.
 56. Rowinsky EK, Gilbert MR, McGuire WP, et al. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J Clin Oncol* 1991;**9**(9):1692-703.
 57. McGuire WP. Taxol: a new drug with significant activity as a salvage therapy in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1993;**51**(1):78-85.
 58. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 1995;**332**(15):1004-14.
 59. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;**334**(1):1-6.
 60. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**(9):699-708.
 61. Piccart MJ, Bertelsen K, Stuart G, et al. Long-term follow-up confirms a survival advantage of the paclitaxel-cisplatin regimen over the cyclophosphamide-cisplatin combination in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;**13 Suppl 2**:144-8.
 62. Bookman MA, Greer BE, Ozols RF. Optimal therapy of advanced ovarian cancer: carboplatin and paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel (GOG158) and an update on GOG0182-ICON5. *Int J Gynecol Cancer* 2003;**13 Suppl 2**:149-55.
 63. Eisenkop SM, Friedman RL, Spirtos NM. The role of secondary cytoreductive surgery in the treatment of patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2000;**88**(1):144-53.
 64. Scarabelli C, Gallo A, Carbone A. Secondary cytoreductive surgery for patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;**83**(3):504-12.

65. Markman M, Rothman R, Hakes T, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;**9**(3):389-93.
66. Cantu MG, Buda A, Parma G, et al. Randomized controlled trial of single-agent paclitaxel versus cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in patients with recurrent ovarian cancer who responded to first-line platinum-based regimens. *J Clin Oncol* 2002;**20**(5):1232-7.
67. Puglisi F, Piccart M. Trastuzumab and breast cancer. Are we just beyond the prologue of a fascinating story? *Onkologie* 2005;**28**(11):547-9.
68. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 2003;**21**(2):283-90.
69. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, et al. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;**80**(1):98-106.
70. Burger RA SM, Monk BJ, Greer B, Sorosky J. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. ASCO 2005: A5009
71. McGuire WP. Is it time for some new approaches for treating advanced ovarian cancer? *J Natl Cancer Inst* 2006;**98**(15):1024-6.
72. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;**100**(1):57-70.
73. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000;**69**:217-45.
74. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000;**18**(22):3775-81.
75. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**(11):876-85.
76. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:331-67.
77. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**304**(3):437-44.

78. Cannistra SA. When is a "prognostic factor" really prognostic? *J Clin Oncol* 2000;**18**(22):3745-7.
79. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):95-105.
80. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;**80**(2):293-9.
81. Zhan Q, Fan S, Bae I, et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994;**9**(12):3743-51.
82. Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, Cannistra SA. BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**(24):14094-9.
83. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(9):4997-5002.
84. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;**74**(4):597-608.
85. Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997;**89**(2):630-43.
86. Krajewski S, Bodrug S, Gascoyne R, Berean K, Krajewska M, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am J Pathol* 1994;**145**(3):515-25.
87. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;**88**(2):386-401.
88. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):107-13.
89. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):125-32.
90. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):133-47.

91. Annis MG, Yethon JA, Leber B, Andrews DW. There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):115-23.
92. Juin P, Geneste O, Raimbaud E, Hickman JA. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(2-3):251-60.
93. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004;**23**(16):2746-56.
94. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**(9):647-56.
95. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;**2**(5):561-6.
96. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;**346**(9):645-52.
97. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;**344**(11):783-92.
98. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;**346**(4):235-42.
99. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;**22**(5):777-84.
100. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;**22**(5):785-94.
101. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;**350**(21):2129-39.
102. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;**304**(5676):1497-500.
103. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;**226**(4678):1097-9.

104. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985;**41**(3):899-906.
105. Strasser A, Harris AW, Cory S. E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene* 1993;**8**(1):1-9.
106. Linette GP, Hess JL, Sentman CL, Korsmeyer SJ. Peripheral T-cell lymphoma in Ickpr-bcl-2 transgenic mice. *Blood* 1995;**86**(4):1255-60.
107. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;**275**(5302):967-9.
108. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997;**385**(6617):637-40.
109. Ohmori T, Podack ER, Nishio K, et al. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**192**(1):30-6.
110. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995;**86**(5):1903-10.
111. Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka Y. Bax and Bcl-2 expressions predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;**124**(9):503-10.
112. Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology* 1998;**52**(6):1085-90.
113. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985;**229**(4720):1390-3.
114. Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1992;**140**(5):1089-95.
115. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein. *Am J Pathol* 1994;**145**(5):1036-40.
116. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. High prevalence of bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1995;**15**(2):503-5.

117. Schena M, Larsson LG, Gottardi D, et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1992;**79**(11):2981-9.
118. Harada N, Hata H, Yoshida M, et al. Expression of Bcl-2 family of proteins in fresh myeloma cells. *Leukemia* 1998;**12**(11):1817-20.
119. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 2000;**292**(5):225-32.
120. Matsushima H, Kitamura T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kawabe K. Combined analysis with Bcl-2 and P53 immunostaining predicts poorer prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol* 1997;**158**(6):2278-83.
121. Keshgegian AA, Johnston E, Cnaan A. Bcl-2 oncoprotein positivity and high MIB-1 (Ki-67) proliferative rate are independent predictive markers for recurrence in prostate carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1998;**110**(4):443-9.
122. Rajkumar T, Rajan S, Baruah RK, Majhi U, Selvaluxmi G, Vasanthan A. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;**19**(6):556-60.
123. Ye D, Li H, Qian S, Sun Y, Zheng J, Ma Y. bcl-2/bax expression and p53 gene status in human bladder cancer: relationship to early recurrence with intravesical chemotherapy after resection. *J Urol* 1998;**160**(6 Pt 1):2025-8; discussion 2029.
124. Nakata B, Muguruma K, Hirakawa K, et al. Predictive value of Bcl-2 and Bax protein expression for chemotherapeutic effect in gastric cancer. A pilot study. *Oncology* 1998;**55**(6):543-7.
125. Friess H, Lu Z, Andren-Sandberg A, et al. Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer. *Ann Surg* 1998;**228**(6):780-7.
126. Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjanen K. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 1995;**177**(1):49-55.
127. Le MG, Mathieu MC, Douc-Rasy S, et al. c-myc, p53 and bcl-2, apoptosis-related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and a lower risk of metastasis and death in operable patients. *Int J Cancer* 1999;**84**(6):562-7.
128. Nakopoulou L, Michalopoulou A, Giannopoulou I, et al. bcl-2 protein expression is associated with a prognostically favourable phenotype in breast cancer irrespective of p53 immunostaining. *Histopathology* 1999;**34**(4):310-9.

129. Sinicrope FA, Hart J, Michelassi F, Lee JJ. Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;**1**(10):1103-10.
130. Ofner D, Riehemann K, Maier H, et al. Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *Br J Cancer* 1995;**72**(4):981-5.
131. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996;**77**(2):255-64.
132. Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey NA. bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology* 1999;**35**(4):360-7.
133. O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *Embo J* 1996;**15**(24):6979-90.
134. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995;**11**(3):101-5.
135. Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;**12**(3):193-213.
136. Frantz S. Lessons learnt from Genasense's failure. *Nat Rev Drug Discov* 2004;**3**(7):542-3.
137. Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**(6):468-79.
138. Zangemeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, et al. A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res* 2000;**6**(6):2547-55.
139. Holinger EP, Chittenden T, Lutz RJ. Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem* 1999;**274**(19):13298-304.
140. Wang JL, Zhang ZJ, Choksi S, et al. Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res* 2000;**60**(6):1498-502.
141. Walensky LD, Kung AL, Escher I, et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 2004;**305**(5689):1466-70.

142. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;**435**(7042):677-81.
143. Tai YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res* 1999;**59**(9):2121-6.
144. Marone M, Scambia G, Mozzetti S, et al. bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clin Cancer Res* 1998;**4**(2):517-24.
145. Wehrli BM, Krajewski S, Gascoyne RD, Reed JC, Gilks CB. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, mcl-1, and bcl-X expression in ovarian surface epithelial tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1998;**17**(3):255-60.
146. Witty JP, Jensen RA, Johnson AL. Expression and localization of Bcl-2 related proteins in human ovarian cancers. *Anticancer Res* 1998;**18**(2B):1223-30.
147. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;**156**(2):409-17.
148. Kaur TB, Shen T, Gaughan J, et al. Premalignant lesions in the contralateral ovary of women with unilateral ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;**93**(1):69-77.
149. Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herod J, et al. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene* 1995;**11**(7):1217-28.
150. Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K, et al. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1999;**35**(8):1214-9.
151. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998;**16**(8):2583-90.
152. Kupryjanczyk J, Szymanska T, Madry R, et al. Evaluation of clinical significance of TP53, BCL-2, BAX and MEK1 expression in 229 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimen. *Br J Cancer* 2003;**88**(6):848-54.
153. Berker B, Dunder I, Ensari A, Cengiz SD, Simsek E. Prognostic significance of apoptotic index and bcl-2 and p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;**23**(6):505-10.
154. Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DJ. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996;**56**(9):2178-84.

155. Marx D, Binder C, Meden H, et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997;**17**(3C):2233-40.
156. Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours. *Br J Cancer* 1995;**72**(5):1324-9.
157. Diebold J, Baretton G, Felchner M, et al. bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996;**105**(3):341-9.
158. Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH, 2nd, Krajewska M, Reed JC. Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. *Clin Cancer Res* 1997;**3**(2):199-208.
159. Ozols RF, Schwartz PE, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001: 1597-1632.
160. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 1993;**329**(21):1550-9.
161. Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet* 2002;**360**(9332):505-15.
162. Pecorelli S, Benedet JL, Creasman WT, Shepherd JH. FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Int J Gynaecol Obstet* 1999;**65**(3):243-9.
163. Greene FL, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
164. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981;**47**(1):207-14.
165. Willingham MC, Bhalla K. Transient mitotic phase localization of bcl-2 oncoprotein in human carcinoma cells and its possible role in prevention of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1994;**42**(4):441-50.
166. Lu QL, Hanby AM, Nasser Hajibagheri MA, et al. Bcl-2 protein localizes to the chromosomes of mitotic nuclei and is correlated with the cell cycle in cultured epithelial cell lines. *J Cell Sci* 1994;**107** (Pt 2):363-71.
167. Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, et al. Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *J Biol Chem* 2002;**277**(36):33490-500.

168. Strobel T, Tai YT, Korsmeyer S, Cannistra SA. BAD partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 1998;**17**(19):2419-27.
169. Hieken TJ, Velasco JM. Selective or routine axillary disease staging for patients with clinically lymph node-negative breast cancer? *Surgery* 2006;**140**(4):500-7; discussion 507-8.
170. Psyrris A, Kountourakis P, Yu Z, et al. Analysis of p53 protein expression levels on ovarian cancer tissue microarray using automated quantitative analysis elucidates prognostic patient subsets. *Ann Oncol* 2007.
171. Bagnoli M, Balladore E, Luison E, et al. Sensitization of p53-mutated epithelial ovarian cancer to CD95-mediated apoptosis is synergistically induced by cisplatin pretreatment. *Mol Cancer Ther* 2007;**6**(2):762-72.
172. Gomes CP, Andrade LA. PTEN and p53 expression in primary ovarian carcinomas: immunohistochemical study and discussion of pathogenetic mechanisms. *Int J Gynecol Cancer* 2006;**16 Suppl 1**:254-8.
173. Sagarra RA, Andrade LA, Martinez EZ, Pinto GA, Syrjanen KJ, Derchain SF. P53 and Bcl-2 as prognostic predictors in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002;**12**(6):720-7.

5.7 Tables

Table 5.7.1 – Patients Characteristics (n=45)

Clinicopathological parameters	Number of patients	%
Age	<i>Median - 57 years</i>	<i>(22 - 83 years)</i>
Staging FIGO		
IIA	1	2
IIIA	1	2
IIIB	5	11
IIIC	25	55
IV	13	29
Histological type		
Endometrioid	4	9
Serous	29	65
Mucinous	2	4
Non-specific Adenoca	10	22
Grade		
I	3	7
II	20	45
III	2	4
Not graduated	20	44

FIGO – Federation International of Gynecology and Obstetrics

Table 5.7.2 – Antibodies used for immunohistochemical analysis.

Antibody	Name	Manufacture	Dilution	Cell Reading
AntiBcl-2	Polyclonal rabbit anti/mouse Bcl-2	BD Biosciences Pharmingen	1:80	cytoplasmatic
Anti Bcl-x _L	Rabbit anti-Bcl-X Polyclonal Antibody W/Control	BD Biosciences Pharmingen	1:1000	cytoplasmatic
Anti-Bad	Mouse IgG2b / Clone 48 / Pos control A431	BD Biosciences Pharmingen	1:1000	cytoplasmatic
Anti-Bax	Polyclonal Rabbit anti-mouse/rat Bax Antibody	BD Biosciences Pharmingen	1:400	cytoplasmatic
anti-p53	Purified Mouse anti-human p53 Monoclonal Antibody – isótipo mouse IgG1 / clone Pab 1801	BD Biosciences Pharmingen	1:1000	nuclear

Tabela 5.7.3 – Treatment (n=45)

Treatment	Number of patients	%
Abdominal cavity		
Disease limited ovary	4	9
Disease limited pelvis	9	20
Disease limite superior abd	11	24
Peritoneal carcinomatosis	18	40
Lost data	2	4
Debulking		
Carcinomatosis/irressecable	12	27
< 2 cm	22	49
> 2 cm	10	22
No surgery	1	2
Chemoterapy 1st line		
Cisplatin/Paclitaxel	19	42
Carbo/Paclitaxel	14	31
Cisplatin/Ciclophosfamide	5	12
Carbo/Ciclophosfamide	1	2
Carboplatin	2	4.5
Tamoxifen	1	2
Melphalan	1	2
No	2	4.5
Response		
Complete Response	25	55
Partial R/StableD	8	18
Progression	3	7
Death	2	4
Abandoned	3	7
Toxicity	1	2
Death post-surgery	3	7
Number of cycles		
1	2	4
2	4	10
3	1	2
5	1	2
6	28	62
7	3	7
8	1	2
10	1	2
0	4	9

Table 5.7.4 – Immunohistochemical results (n=45)

Imunohistochemical	Number of patients	%
Bcl-2		
Positive	22	49
Negative	23	51
Bcl-x_L		
Positive	36	80
Negative	9	20
Bax		
Positive	44	98
Negative	1	2
Bad		
Positive	39	87
Negative	6	13
p53		
Positive	26	58
Negative	19	42

Table 5.7.5 – Treatment response analysis based on proteins expression

Proteins	IHC	Response to first line chemotherapy treatment			<i>P</i> value
		Complete	Partial/Stable	Progression	
Bcl2	Negative	13	3	2	0.49
	Positive	12	5	1	
Bcl-x_L	Negative	6	2	1	0.86
	Positive	19	6	2	
Bax	Negative	0	1	0	0.44
	Positive	25	7	3	
Bad	Negative	3	1	1	0.61
	Positive	22	7	2	
p53	Negative	10	5	2	0.79
	Positive	15	3	2	

IHC - Immunohistochemical

Table 5.7.6 – Analysis of disease free survival based on proteins expression

Proteins	IHC	DFS median	CI 95%	Log-rank P value
		<i>Months</i>		
Bcl2	Negative	40	(9.7 - 70.2)	<i>0.90</i>
	Positive	16	(0 - 53.2)	
Bcl-x_L	Negative	16	(8.7 - 23.2)	<i>0.29</i>
	Positive	40	(22.3 - 57.7)	
Bax	Negative	58	-	<i>0.86</i>
	Positive	35	(10,2 - 59.7)	
Bad	Negative	47	(0 - 104)	<i>0.66</i>
	Positive	40	(11.2 - 58.8)	
p53	Negative	58	(39.8 - 76.2)	<i>0.04</i>
	Positive	16	(6.2 - 25.8)	

IHC – Immunohistochemical, DFS – Disease free survival
CI – Confidence Interval

Table 5.7.7 – Analysis of Overall survival based on Proteins expression

Proteins	IHC	OS median	CI 95%	Log-rank P value
		<i>Months</i>		
Bcl2	Negative	40	(9.7 - 70.2)	<i>0.83</i>
	Positive	16	(0 - 68.3)	
Bcl-x_L	Negative	16	(8.8 - 23.2)	<i>0.37</i>
	Positive	47	(26.4 - 67.6)	
Bax	Negative	58	(2.9 - 67)	<i>0.99</i>
	Positive	35		
Bad	Negative	47	(0 - 14)	<i>0.89</i>
	Positive	35	(6.3 - 63.6)	
p53	Negative	58	(39.8 - 76.1)	<i>0.15</i>
	Positive	16	(6.2 - 25.8)	

IHC – Immunohistochemical, OS – Overall survival, CI – Confidence interval

Table 5.7.8 – Estudos sobre a associação entre as proteínas da família Bcl-2, p53 e o Carcinoma Epitelial de Ovário

Author	N	Bcl-2	Bax	Bcl-X _L	P53	
Berker ¹⁵³ † (Turkey)	50	50%	-	-	66%	No association.
Herod ¹⁵⁴ † (United Kingdom)	70	57%	-	-	61%	P53 associated with worst survival Bcl-2 associated with better survival.
Mano ¹⁵⁰ † (Japan)	66	42%	-	-	45%	Bcl-2 associated with worst response and worst survival.
Baekelandt ⁷⁴ * (Norway)	185	39%	66%	62%	49%	Bcl2 pos and p53 neg associated with better survival Bcl2 and Bax, one neg and the other pos associated with better survival.
Chan ¹⁴⁷ † (USA)	46	33%	-	-	54%	Inverse association between Bcl-2 and p53 expression.
Marx ¹⁵⁵ † (USA)	215	30%	47%	-	-	Bcl-2 associated with good prognosis Bax associated with bad prognosis.
Henriksen ¹⁵⁶ † (Denmark)	50	48%	-	-	-	Inverse association between Bcl2 and p53 expression Bcl-2 neg associated with worst survival
Tai ^{151*} (USA)	45	-	60%	-	-	Bax pos associated with better response to paclitaxel and better DFS.
Kupryajczyk ¹⁵² # (Poland)	229	32%	43%	-	59%	Ba pos associated with CR Bax pos together with p53 pos associated with better DFS.

Prospective studies. † Retrospective studies. SLD- Disease Free Survival

CR – Complete Response.

Neg - negative Pos - positive

5.8 Figures

CID register – C56 on HCPA = 370 cases (list supplied by hospital general archives, compared to surgery lists and cancer registers)

Revised: 370 cases

* 112 cases wrong classification as Epithelial Ovarian Carcinoma

- Teratomas = 11cases
- Beningn ovarian cysts = 84 cases
- Borderline tumors = 17 cases

* 85 mistakes in classification

* 42 cases without localized resgister (afetr three different total reviews, repeated in 2 years)

131 patients considered to inclusion in the cohort

86 exclusion

- 35 patients with partial treatment in HCPA
- 49 patients without material to IHC:
 - 10 cytopathologic diagnosis (CP only)
 - 04 cases without anatomopathologic analysis (AP), neither CP
 - 19 cases withour paraffin blocks localized
 - 04 cases treated with neoadjuvant chemotherapy
 - 10 patients reffused any kind of treatment
- 02 patients without treatment because serious mental problems
- 02 patients inadequate surgery procedure

→ 45 inclusions

Figure 5.8.1 – Patients in the study

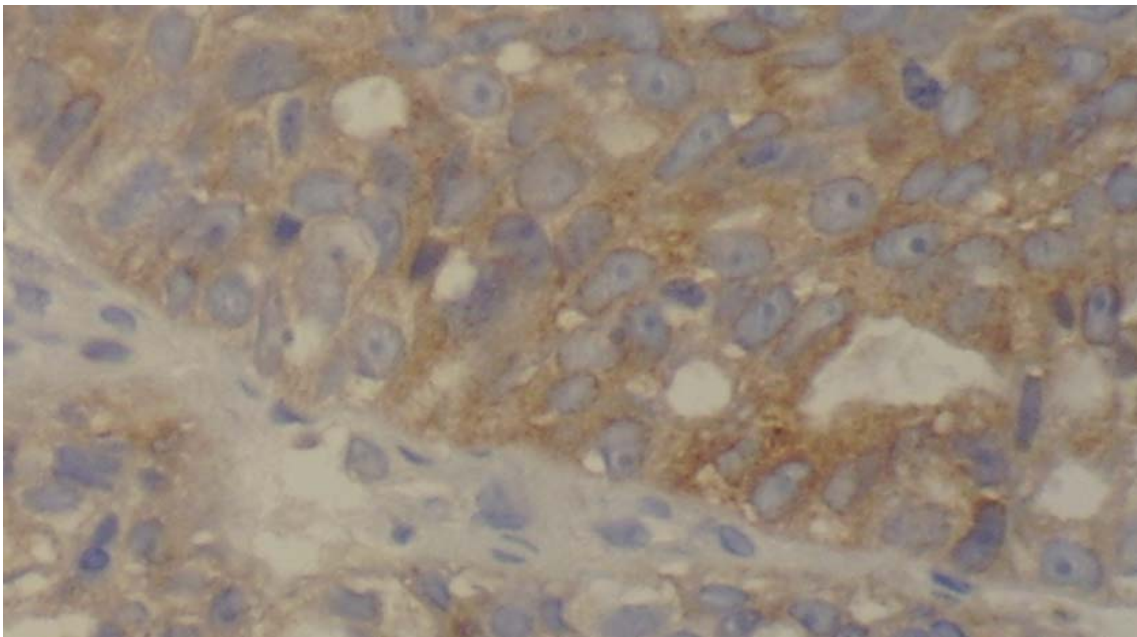
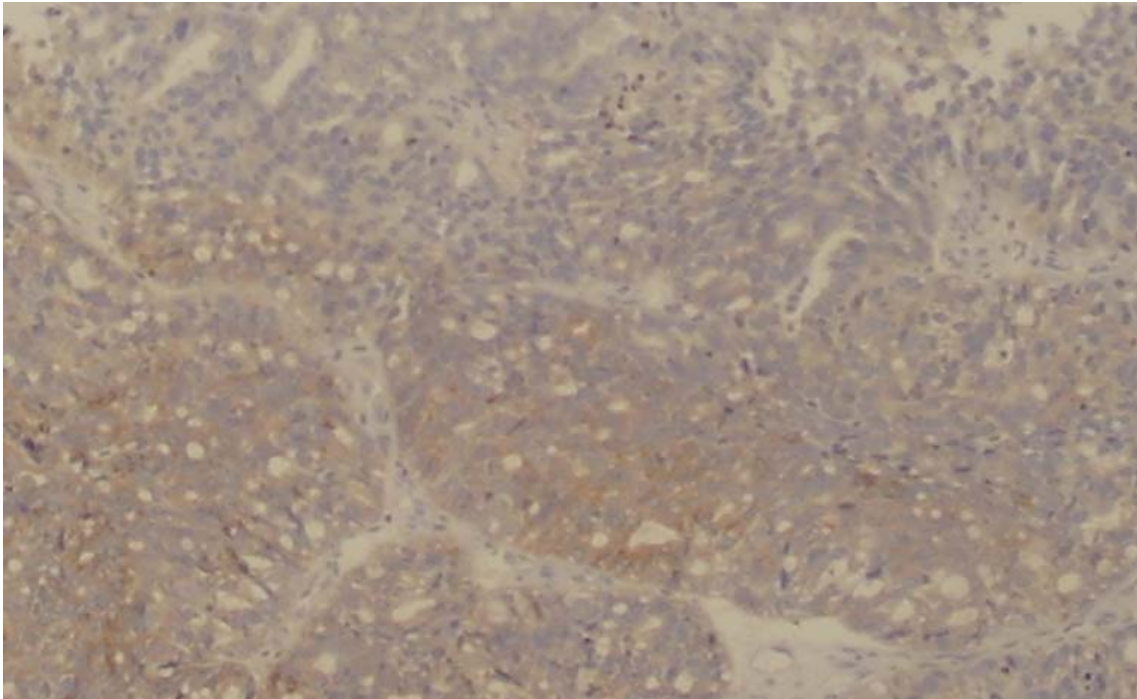


Figure 5.8.2 – Bcl2 positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)

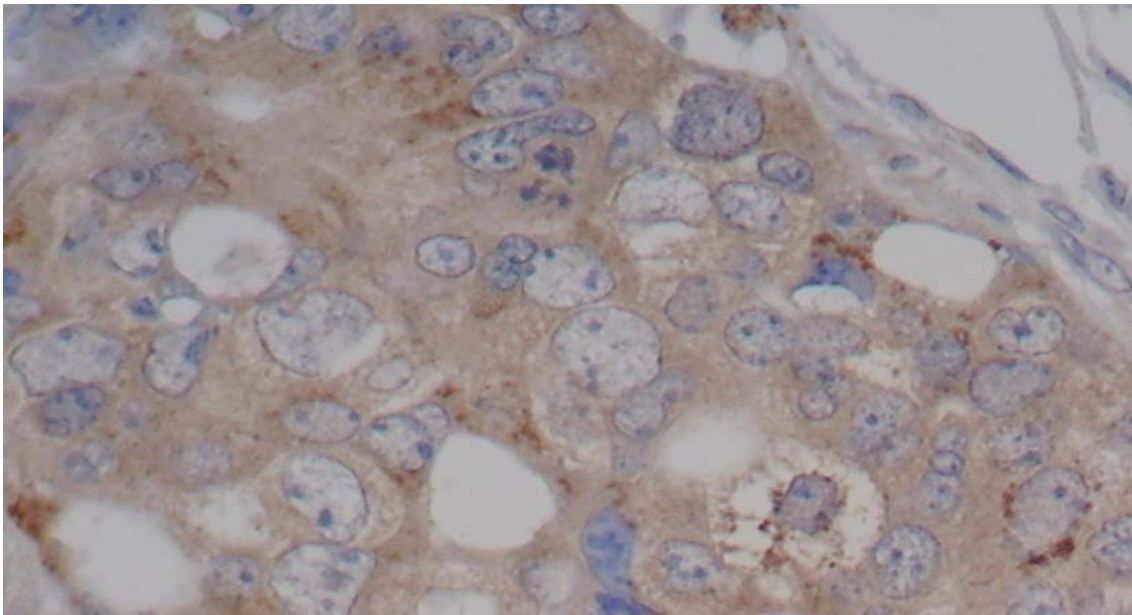
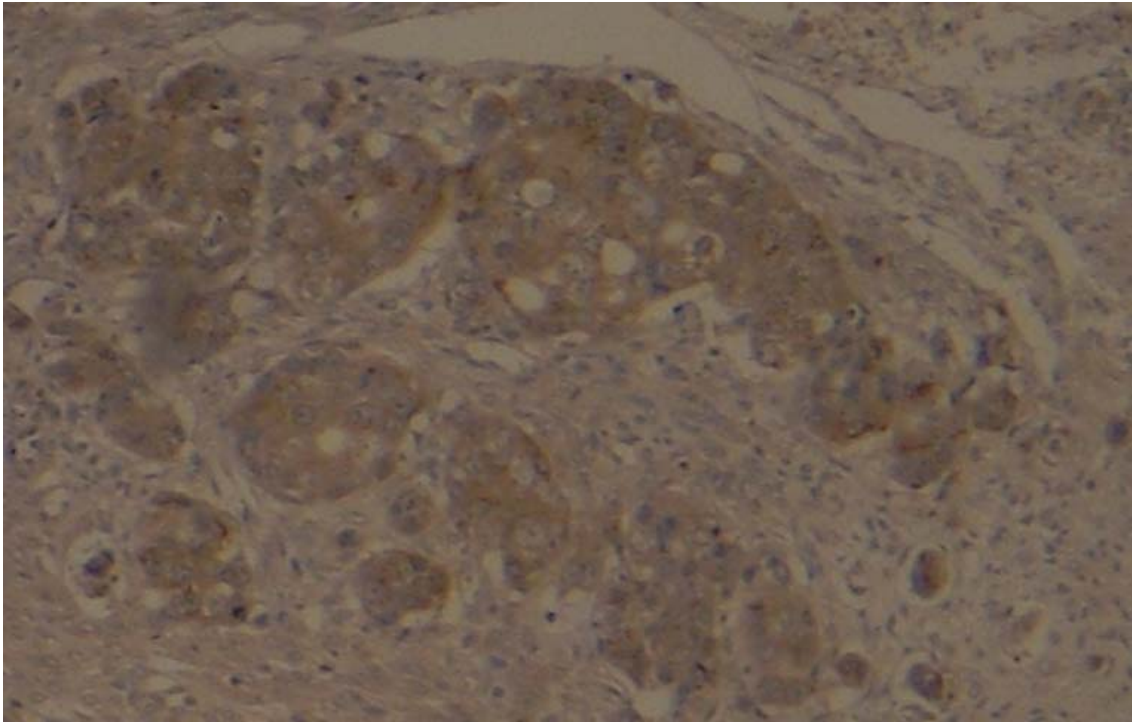


Figure 5.8.3 – Bcl-x_L positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)

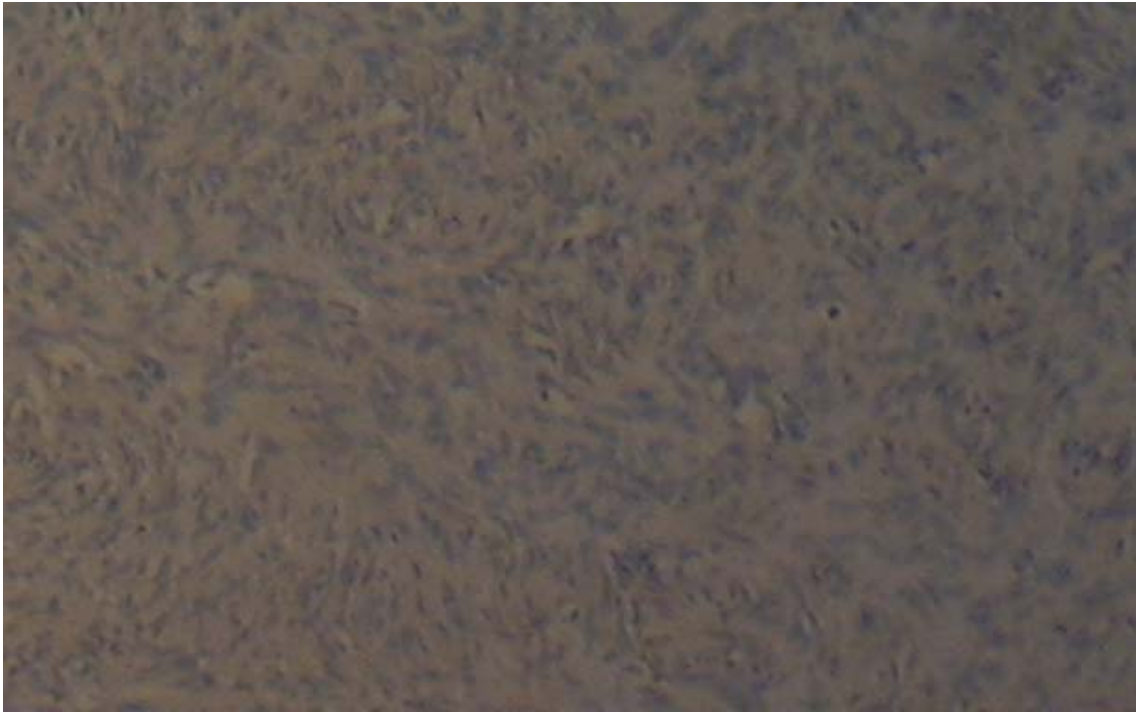


Figure 5.9.4 – Bcl-x_L negative Immunohistochemical. (100x)

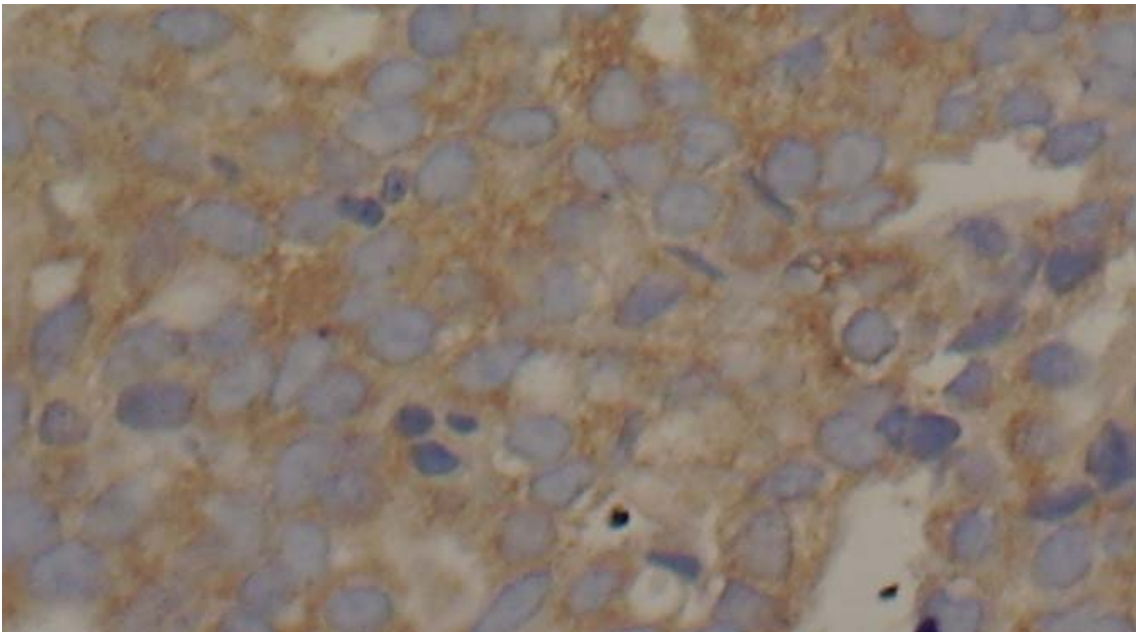
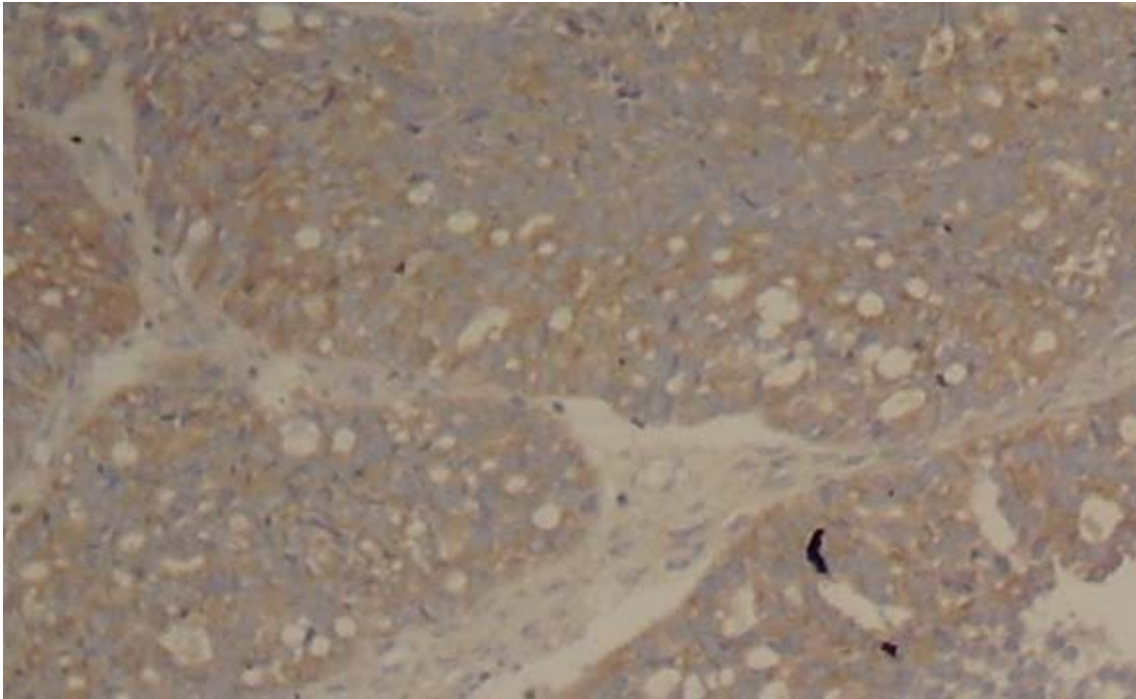


Figure 5.9.5 – Bad positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)

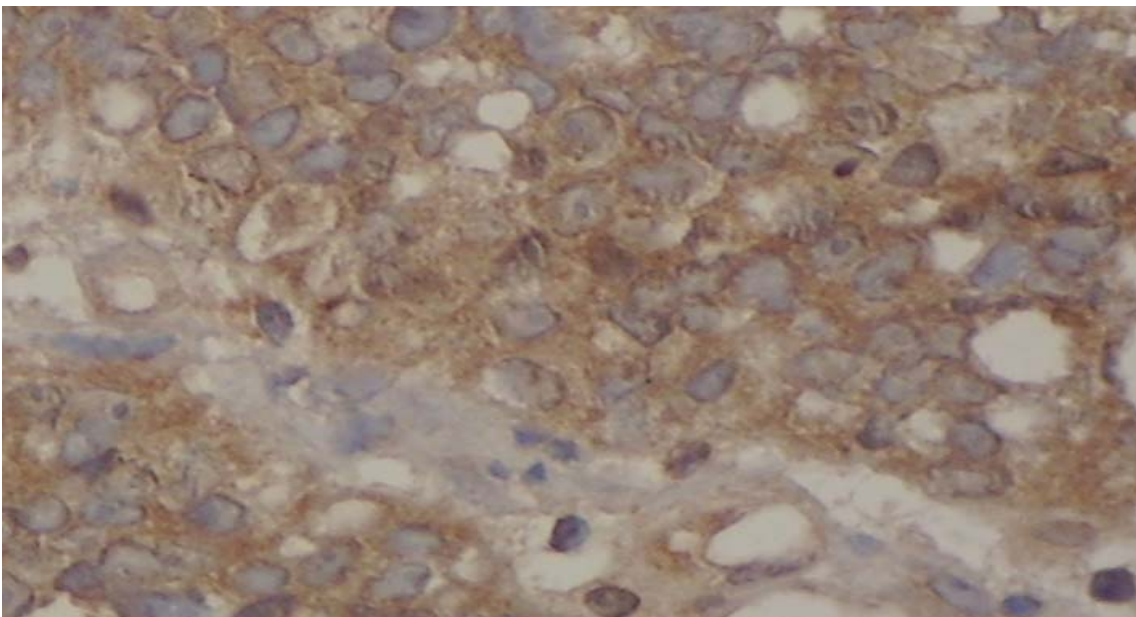
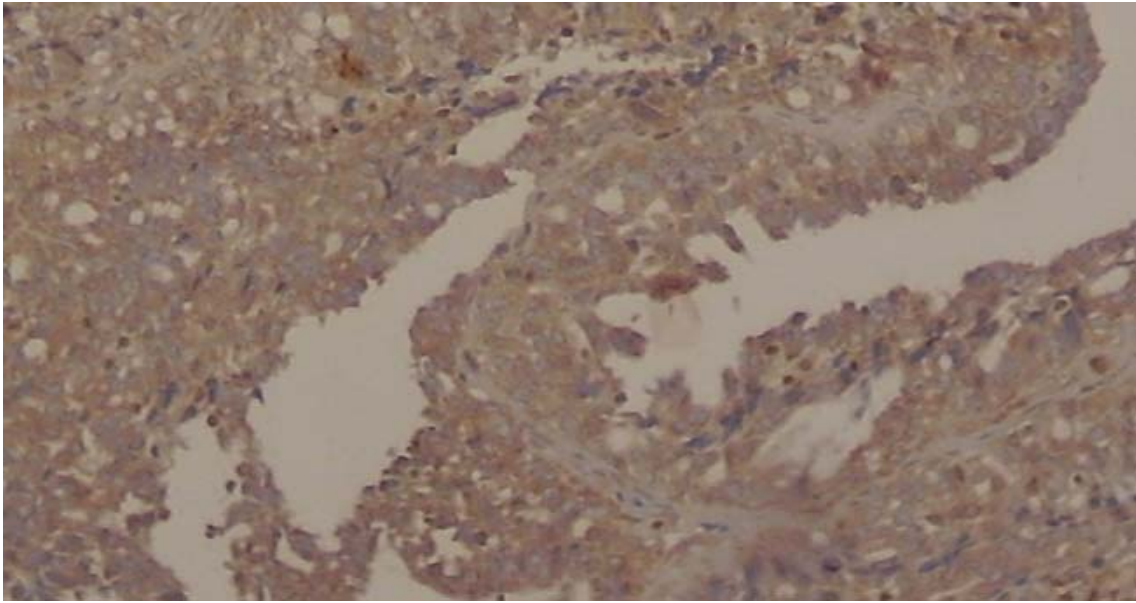


Figure 5.9.6 – Bax positive Immunohistochemical. (top 100x, bottom 400x)

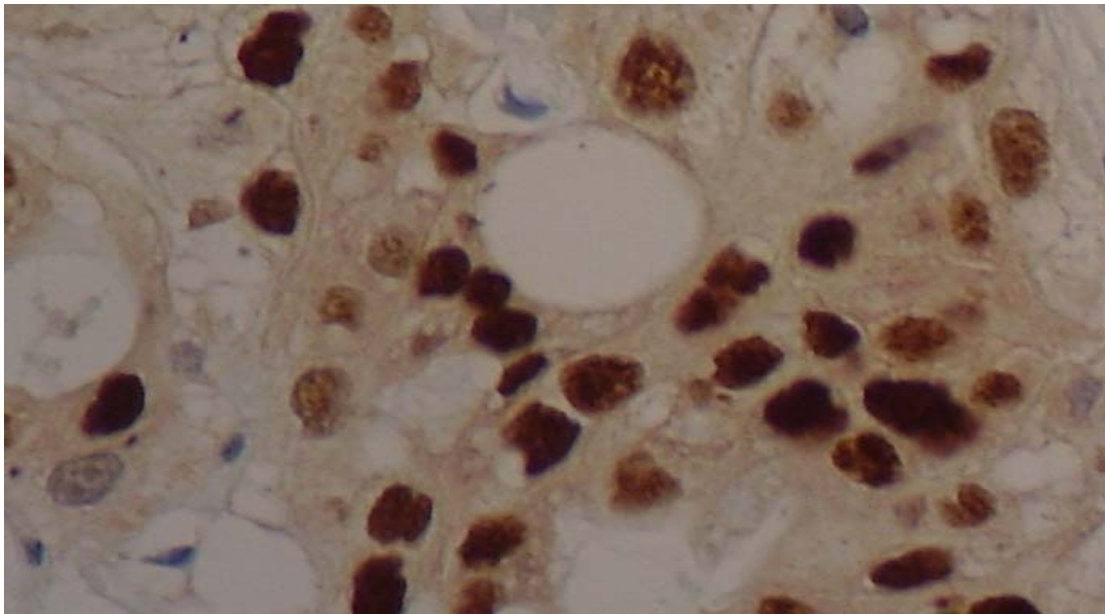
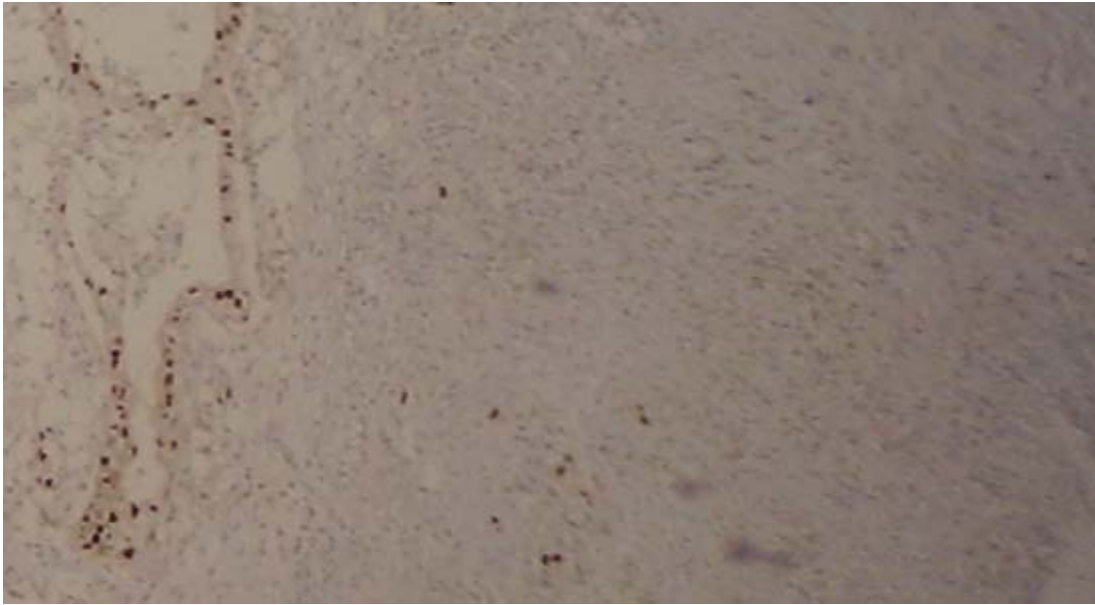


Figure 5.9.7 – p53 positive Immunohistochemical. (top 40x, bottom 400x)

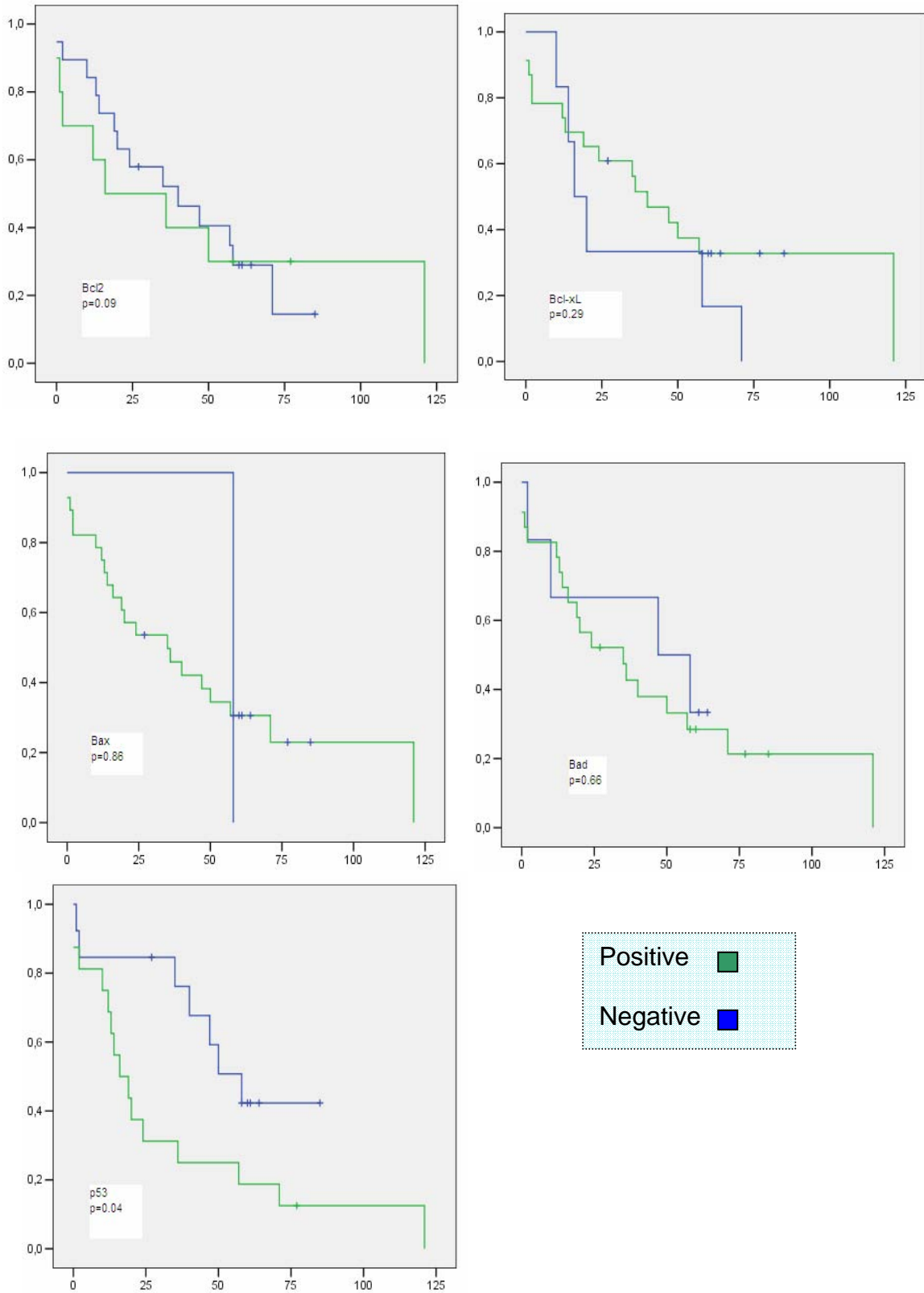


Figure 5.9.8 – Kaplan-Meier Bcl-2 / p53 proteins and Disease free survival.

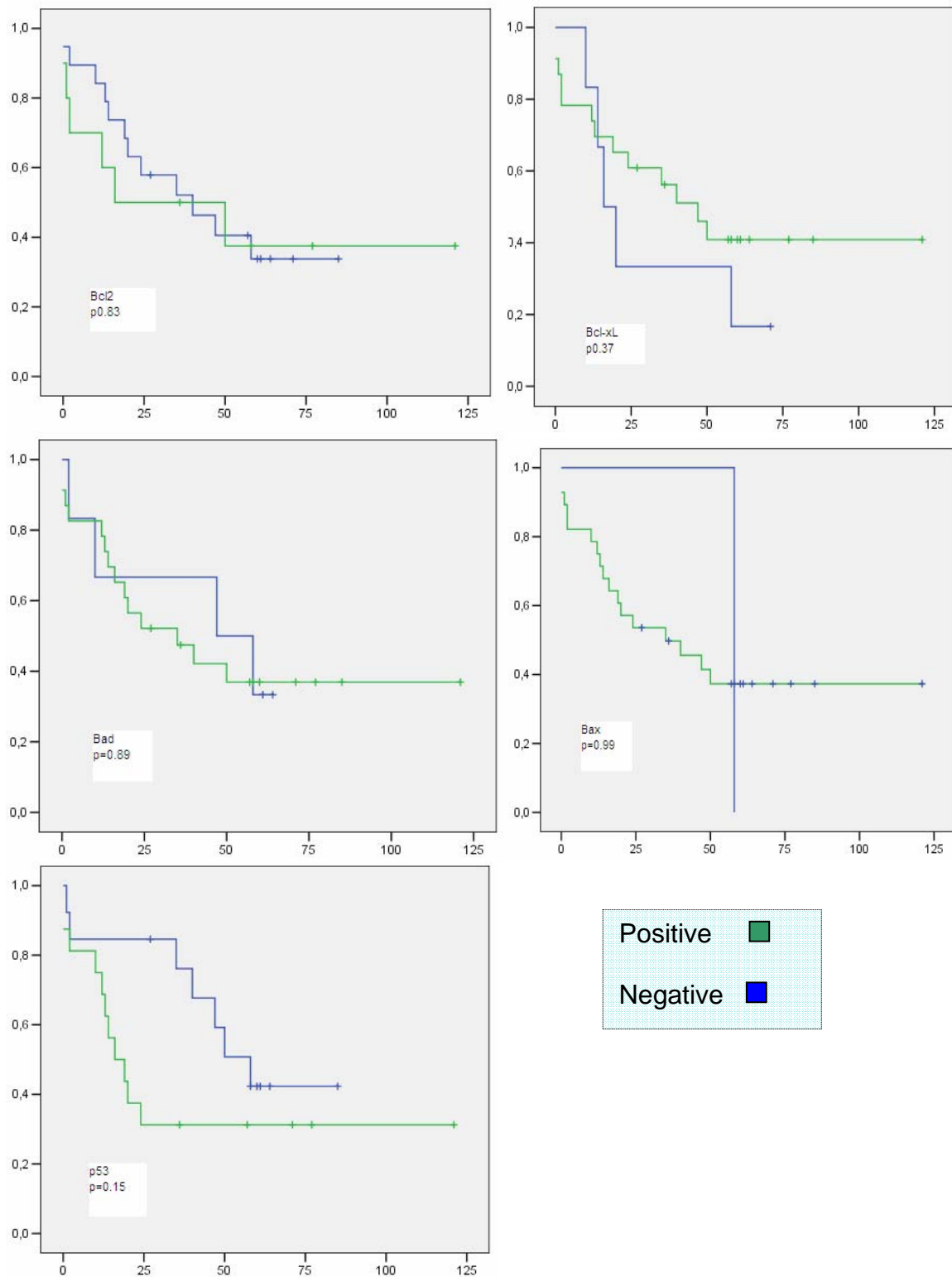


Figure 5.9.9 – Kaplan-Meier - Bcl2 / p53 Proteins and General survival

6.0 Conclusões e perspectivas futuras

O padrão de expressão das proteínas da família Bcl-2 e proteína p53, encontrado nesta amostra de pacientes com carcinoma epitelial de ovário, foi similar ao descrito na literatura mundial disponível. A expressão positiva de p53 demonstrou correlação com menor sobrevida livre de doença na análise univariada, o que aponta para as investigações já em andamento acerca desta proteína, suas mutações e seu potencial como alvo terapêutico. As proteínas da família Bcl-2 não se correlacionaram com resposta ao tratamento ou sobrevida nesta amostra e requerem investigações em estudos prospectivos, utilizando novas tecnologias de detecção.

Uma vez que temos uma avaliação inicial da prevalência de expressão positiva das proteínas da família Bcl-2 e do p53 em pacientes com carcinoma epitelial de ovário do HCPA; bem como uma idéia geral de suas características clínicas, a idéia futura é uma avaliação prospectiva desses fatores.

A coleta de material biológico para futuras análises com técnicas laboratoriais mais avançadas, como o microarray, é algo que deve fazer parte de qualquer idéia de pesquisa futura neste campo, visando a translação de fatores clínicos em marcadores ou alvos biológicos em cada neoplasia e, especificamente aqui, no carcinoma de ovário

A idéia de desenvolver um ambulatório específico de ginecologia oncológica e oncologia clínica, com base neste trabalho e em vários outros focados nesta área é algo que deve ser pensado e discutido. A possibilidade de cuidados mais específicos e geração de material de pesquisa nesta área ganharia com isso .