



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Expressão dos marcadores de imunoterapia PD-1, PD-L1, CD8, MSI e p53 em
carcinoma seroso avançado de ovário.**

Aluna: **Ana Paula Dergham**

Orientadora: Dra. Vanessa Santos Sotomaior

Coorientadora: Dra. Lucia de Noronha

Curitiba, março de 2022.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Expressão dos marcadores de imunoterapia PD-1, PD-L1, CD8, MSI e p53 em
carcinoma seroso avançado de ovário.**

Dissertação de mestrado acadêmico
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Vanessa Santos Sotomaior
Coorientadora: Dra. Lucia de Noronha

Curitiba, março de 2022.

AGRADECIMENTOS

Ao inestimável trabalho de orientadora do meu mestrado, Dra. Vanessa Sotomaior, e admiração pela professora que é. Impossível mensurar o valor do que fez na minha formação.

À dedicação da Dra. Lúcia de Noronha com os alunos, aqui me incluo, na Patologia Experimental, proporcionando o encontro com a célula do câncer.

À Dra. Márcia Olandoski, pela disponibilidade e expertise na análise estatística dos dados deste estudo.

À Caroline Busatta Vaz de Paula, farmacêutica e doutora em Ciências da Saúde, e ao Seigo Nagashima, biólogo bacharel e Mestre em Ciências da Saúde, pelo excelente trabalho no preparo do material tumoral para as análises no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR e pelo tempo e paciência que tiveram comigo na bancada todos esses meses.

Ao extraordinário trabalho de secretária, e braço direito, da estudante de medicina Michelle Bueno, sem a qual o andamento deste mestrado não seria possível.

Aos amigos, excelentes profissionais e grandes parceiros de trabalho, oncologistas clínicos, Dr. Fernando Chicoski, Dr. Júlio Cesar Figueira e Dr. Jean Carlos Wisnieski, os quais me possibilitaram flexibilização de agenda de consultórios e proporcionaram suporte para os pacientes na minha ausência.

Às secretárias da Clínica Neo Saúde (Daniela Carula, Ellen Araújo, Sandra Fonseca e Maiara Bagio), onde trabalho, por resolverem e compreenderem as diversas trocas de horários e ajustes de agendas resolvendo tudo com muito cuidado e atenção aos meus pacientes.

À doutoranda Claudia Caroline Veloso da Silva e a mestre Bianca Borges Cabral, pelo auxílio em tudo que precisei na PUCPR.

À acadêmica de biologia Luisa Lencioni de Mendonça, que me ajudou muito na coleta de dados dos prontuários das pacientes.

Ao trabalho incontestável de pai do Jorge Issa com nosso filho André, proporcionando tempo para eu estudar.

Aos meus pais Talal Dergham e Maria Ana Issa por que me permitiram sempre estudar.

Às pacientes de câncer de ovário, donas dos materiais que me possibilitaram a realização deste estudo e pelas quais acompanhei, algumas ainda acompanho, admiro e aprendo com a jornada de luta contra esta neoplasia maligna.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho, André Jorge Issa, que me concedeu e concede muitas vezes o tempo destinado a ele para o trabalho.

E, ainda, ao Dr. Marcelo de Souza Rodrigues de Oliveira, *in memoriam*, falecido em 2019, quando do início deste projeto. Ser humano excepcional e excelente oncologista clínico que tive o privilégio de conhecer e conviver por mais de 10 anos, com quem aprendi muita oncologia e além da oncologia. Ao seu lado, também ganhei experiência, e segurança na prática clínica, além de resiliência na jornada de cuidado do paciente com câncer.

O câncer é o menos maligno.

(Autor desconhecido)

IDENTIFICAÇÃO DA BANCA

A. P. Dergham. Expressão dos marcadores de imunoterapia PD-1, PD-L1, CD8, MSI e p53 em carcinoma seroso avançado de ovário. Projeto de mestrado acadêmico apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovado em: 23 / 03 / 2022

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula Percicote Instituição: UFPR

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Raul Alberto Anselmi Júnior Instituição: Hospital Nossa Senhora das Graças

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Andrea N. Moreno Amaral Instituição: PPGCS, PUCPR

Julgamento: _____ Assinatura: _____

O projeto de mestrado acadêmico foi elaborado em formato tradicional, com citação bibliográfica seguindo a normatização estabelecida pela ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Patologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). O estudo recebeu suporte financeiro da PUCPR. Declaramos que não houve conflito de interesse na realização do presente projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação do desenvolvimento do carcinoma seroso de alto grau	11
Figura 2.	Análise morfológica de PD-L1	28
Figura 3.	Análise de PD-1	29
Figura 4.	Análise de CD8	30
Figura 5.	Análise de MLH1	31
Figura 6.	Análise de MSH2	31
Figura 7.	Análise de MSH6	32
Figura 8.	Análise de PMS2	33
Figura 9.	Análise morfológica de p53	34
Figura 10.	Curva mostrando a diferença de recidiva entre as pacientes com diferentes <i>status</i> de MSI	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características dos anticorpos empregados nos testes imunoistoquímicos	26
Tabela 2.	Caracterização clínico-patológica quantitativa das pacientes estudadas	36
Tabela 3.	Caracterização clínico-patológica categórica das pacientes estudadas	38
Tabela 4.	Expressão imunoistoquímica das proteínas PD-1,PD-L1 e CD8	39
Tabela 5.	Expressão imunoistoquímica das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e p53	39
Tabela 6.	Expressão imunoistoquímica de p53 e MSI	39
Tabela 7.	Associação dos perfis de expressão de PD-1 e PD-L1 ao grau do carcinoma seroso de ovário e estágio clínico	40
Tabela 8.	Associação do <i>status</i> de MSI à expressão de PD-1e PD-L1 e à proporção CD8/PD-1	41
Tabela 9.	Associação do <i>status</i> de MSI ao grau do carcinoma seroso de ovário, estágio clínico e à sensibilidade à platina	41
Tabela 10.	Associação da expressão de p53 ao grau do carcinoma seroso de ovário e estágio clínico	42
Tabela 11.	Correlação da idade ao diagnóstico em anos e a expressão de PD-1 e PD-L1	42
Tabela 12.	Associação da idade ao diagnóstico em anos e a expressão de p53	42
Tabela 13.	Associação de recidiva e idade ao diagnóstico em anos, expressão de PD-1 e PD-L1 e a proporção de CD8/PD-1	43
Tabela 14.	Associação de recidiva e expressão de p53, do <i>status</i> de MSI, do estágio clínico e do grau do carcinoma seroso	43
Tabela 15.	Associação do óbito e idade ao diagnóstico em anos, expressão de PD-1 e PD-L1 e a proporção de CD8/PD-1	44
Tabela 16.	Associação de recidiva e expressão de p53, do <i>status</i> de MSI, do estágio clínico e do grau do carcinoma seroso	44

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AVC	acidente vascular cerebral
<i>BRCA1</i>	do inglês, <i>BRCA1 DNA repair associated</i>
<i>BRCA2</i>	do inglês, <i>BRCA2 DNA repair associated</i>
CCSO	citorredução completa
DAC	doença arterial coronariana
EC	estadiamento clínico tumoral
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HE	coloração hematoxilina-eosina
HER2	receptor de fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>)
HGSC	carcinoma seroso de alto grau (do inglês, <i>high-grade serous carcinoma</i>)
HR	taxa de risco (do inglês, <i>hazard ratio</i>)
IMC	índice de massa corpórea
IPARP	Inibidor da enzima PARP Poli (ADP-ribose) polimerase
MLH1	do inglês, <i>mutL homolog 1</i>
MLH3	do inglês, <i>mutL homolog 3</i>
MMR	reparo de incompatibilidade (do inglês, <i>mismatch repair</i>)
MSH2	do inglês, <i>mutS homolog 2</i>
MSH6	do inglês, <i>mutS homolog 6</i>
MSI	instabilidade de microssatélite (do inglês, <i>microsatellite instability</i>)
MSI-H	alta instabilidade de microssatélite (do inglês, <i>microsatellite instability-high</i>)
<i>MUC16</i>	do inglês, <i>mucin 16, cell surface associated</i>
p53	proteína de tumor de massa molecular 53kDa
PARP	polis da polimerase do ADP-ribose (do inglês, <i>poly ADP-ribose polymerase</i>)
PCI	Índice de carcinomatose peritoneal (do inglês, <i>peritoneal cancer index</i>)
PD-1	proteína de morte celular programada 1 (do inglês, <i>programmed cell death 1</i>)
PD-L1	ligante de morte celular programada 1 (do inglês, <i>programmed cell death 1 ligand</i>)
PETCT	tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PMS2	do inglês, <i>post meiotic segregation increased 2</i>
RE	receptor de estrógeno

RP	receptor de progesterona
RMN	ressonância magnética nuclear
SC	superfície corpórea
SNC	sistema nervoso central
STIC	carcinoma intraepitelial seroso da tuba (do inglês, <i>serous tubal intraepithelial carcinoma</i>)
TILs	linfócitos infiltrantes de tumor (do inglês, <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TMA	do inglês, <i>tissue microarray</i>
TMB	carga mutacional tumoral (do inglês, <i>tumor burden mutation</i>)
TNM	tamanho do tumor, linfonodos, metástases (do inglês, <i>tumor, nodes, metastasis</i>)
TP53	gene supressor de tumor p53 (do inglês, <i>tumor protein p53</i>)
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WT1	proteína supressora tumoral (do inglês, <i>WNT family member 1</i>)

RESUMO

Introdução: O adenocarcinoma seroso de alto grau de ovário avançado constitui uma neoplasia maligna grave, de diagnóstico tardio e alta mortalidade que incide principalmente nas mulheres pós-menopausa. O tratamento padrão é a cirurgia seguida de quimioterapia com carboplatina e paclitaxel nos estágios mais avançados. Mesmo assim, o prognóstico é desfavorável. Por isto, alternativas, como os inibidores de PARP, estão no arsenal de tratamento do câncer de ovário e outras em estudo, como a imunoterapia.

Objetivos: Avaliar a expressão dos marcadores de imunoterapia PD-1, PD-L1, CD8, MSI (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) e p53 em amostras de carcinoma seroso avançado de ovário.

Metodologia: Foi realizado um estudo retrospectivo de 28 casos de pacientes com carcinoma seroso avançado de ovário ECIII ou IV (CID C56) de dois hospitais de Curitiba, Brasil, no período de 2009 a 2020. Foram revisados as lâminas e os dados dos prontuários das pacientes para prover as informações clínicas e patológicas relevantes a fim de representar o fenótipo de cada caso. Para tanto, foram conduzidos testes imunoistoquímicos e subsequente análise dos marcadores propostos. Os resultados da expressão imunoistoquímica foram correlacionados com os dados clínico-patológicos dos prontuários.

Resultados: A média de idade das pacientes ao diagnóstico foi de 61 anos. O estágio clínico mais comum ao diagnóstico foi ECIIIC (60%). Apresentavam sensibilidade à platina 92% das pacientes. Todavia, mais de 50% recidivaram após o tratamento padrão. A maior parte (84,6%) das amostras analisadas tinham superexpressão de p53. Eram portadoras de MSI 14,8% das pacientes. As amostras com estabilidade de microssatélites apresentaram maior proporção de CD8/PD-1 e as pacientes nesta condição recidivaram menos. Por outro lado, houve associação de recidiva com a instabilidade de MSI ($p=0,03$). Assim sendo, a presença de MSI impactou na sobrevida livre de recidiva neste estudo.

Conclusões: Há viabilidade de análise dos marcadores PD-1, PD-L1, CD8, MSI e p53 em amostras de carcinoma epitelial seroso avançado de ovário. Houve associação de recidiva com a MSI.

Palavras-chave: câncer de ovário; imunoterapia; ponto de controle imunológico

ABSTRACT

Introduction: Advanced high-grade serous adenocarcinoma of the ovary is a severe malignant neoplasm, with late diagnosis and high mortality that mainly affects in post-menopausal women. The standard treatment is surgery followed by chemotherapy with carboplatin and paclitaxel in the more advanced stages. Even so, the prognosis is unfavorable. Therefore, alternatives, such as PARP inhibitors, are in the arsenal of treatment of ovarian cancer and others under study, such as immunotherapy. **Objectives:** Evaluate the expression of immunotherapy markers PD-1, PD-L1, CD8, MSI (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) and p53 in advanced serous ovarian carcinoma. **Methodology:** A retrospective study of 28 cases of patients with advanced serous carcinoma of the ovary ECIII or IV (ICD C56) from two hospitals in Curitiba, Brazil, from 2009 to 2020 was conducted. Slides and data from the patients' charts were reviewed to provide information on relevant clinical and pathological conditions in order to represent the phenotype of each case. Therefore, immunohistochemical tests and subsequent analysis of the proposed markers were carried out. The immunohistochemical expression results were correlated with the clinicopathological data from medical records. **Results:** The mean age of patients at diagnosis was 61 years. The most common clinical stage at diagnosis was ECIIIC (60%). 92% of patients were sensitive to platinum. However, more than 50% relapsed after standard treatment. Most (84,6%) of the analyzed samples had overexpression of p53. MSI was found in 14,8% of cases. Samples with MSI stability tend to have a higher proportion of CD8/PD-1 and the patients in this condition relapse less. On the other hand, there was an association of recurrence with MSI instability ($p= 0,03$). Therefore, microsatellite instability had an impact in recurrence-free survival in this study. **Conclusions:** There is feasibility of analyzing the markers PD-1, PD-L1, CD8, MSI and p53 in samples of advanced serous epithelial ovarian carcinoma. There was an association of recurrence with MSI.

Keywords: ovarian cancer, immunotherapy, immune checkpoint.

RESUMO POPULAR

O câncer de ovário é muito perigoso para as mulheres, apesar do câncer de mama ser mais comum e comentado. Os dois podem ser tratados com cirurgia e quimioterapia, mas o câncer de ovário é mais difícil de operar. Mesmo quando o médico consegue retirar todo o tumor e as pacientes com câncer de ovário fazem quimioterapia após a cirurgia, muitas delas acabam morrendo. Assim, novas formas de tratar o câncer de ovário têm sido pesquisadas. A imunoterapia é um exemplo. Este tratamento é realizado com remédios que fazem as células de defesa do corpo combater melhor as células do câncer. A imunoterapia já é utilizada contra o câncer de pulmão e o melanoma, um tipo grave de câncer de pele. Para saber se os novos tratamentos funcionam e para quem funcionam, os pesquisadores analisam biomarcadores. Eles são proteínas e partes do DNA que aparecem diferentes nas células do câncer em comparação com as células normais. Este trabalho estudou a expressão de biomarcadores que provavelmente poderão ajudar a entender se e para quais pacientes a imunoterapia funcionaria melhor para tratar um dos tipos mais agressivos de câncer de ovário, o seroso de alto grau avançado. Assim, os biomarcadores PD-1, PD-L1, CD8, MSI e p53 foram analisados no laboratório em amostras de câncer retiradas durante a cirurgia de 28 pacientes. Os resultados do laboratório foram avaliados considerando informações que estavam nos prontuários médicos, por exemplo, a idade que a paciente tinha quando descobriu que estava com câncer e se o câncer estava no começo ou já tinha se espalhado. Foi possível observar que estas pacientes estudadas eram mais velhas, a maioria tinha mais de 60 anos de idade. Quando elas descobriram a doença, ela já estava adiantada. O tratamento com quimioterapia funcionou no início, mas depois o câncer voltou. Neste estudo foi possível analisar o perfil de expressão ao microscópio dos biomarcadores escolhidos e conhecer melhor as características das células dos tumores de câncer de ovário seroso de alto grau. Estes resultados somados aos de outros estudos vão ajudar na indicação, ou não, da imunoterapia para o tratamento de câncer de ovário avançado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 JUSTIFICATIVA	03
3 REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1 O câncer de ovário	04
3.2 Classificação do câncer de ovário	08
3.3 Estadiamento do câncer de ovário	11
3.4 Marcadores de instabilidade de microssatélite	13
3.5 A imunoterapia e seus marcadores	14
4 OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Pacientes e amostras	21
5.2 Descrição das variáveis analisadas	22
5.3 Análise histológica	24
5.4 Testes imunoistoquímicos	24
5.4.1 PD-1, PD-L1, CD8 e p53	25
5.4.2 MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2	26
5.5 Análise da imunoexpressão tecidual	27
5.5.1 PD-L1	27
5.5.2 PD-1 e CD8	29
5.5.3 MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2	30
5.5.4 p53	33
5.6 Análise estatística	34
6 RESULTADOS	36
6.1 Características clínico-patológicas	36
6.2 Perfis de expressão imunoistoquímica proteica tumoral	39
6.3 Análise comparativa da expressão imunoistoquímica dos marcadores estudados e características clínico-patológicas das pacientes	40
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÕES	51
9 REFERÊNCIAS	52
10 ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma seroso de ovário de alto grau avançado (ECIII e ECIV) é o subtipo de câncer de ovário mais comum e de maior letalidade para as mulheres. Não obstante a evolução da sua terapêutica, as taxas de sucesso no seu tratamento permanecem reduzidas e pouco duradouras. As recidivas são o padrão. A perda da sensibilidade à platina, principal droga no tratamento deste subtipo de câncer de ovário, correlaciona-se com mal prognóstico. A cirurgia continua sendo a base do seu tratamento. As novas técnicas cirúrgicas e o treinamento mais efetivo do cirurgião especializado em ginecologia oncológica ou oncologia cirúrgica vem contribuindo para a ressecção completa, mas não excluem a possibilidade de recidiva. A introdução de novas drogas, como os antiangiogênicos e inibidores de PARP, trouxeram ganhos significativos, embora pequenos ainda.

Neste contexto, a imunoterapia surge como possibilidade. Esta classe de drogas foi estudada e validada para outros tipos de câncer e está sendo empregada com sucesso no câncer de pulmão e melanoma. Os resultados dos primeiros estudos em carcinoma seroso de ovário de alto grau avançado com imunoterápicos isolados e/ou associados com drogas convencionais começam a surgir, mas a identificação de quais pacientes podem se beneficiar deste tratamento precisa ser estabelecido.

O diagnóstico anatomopatológico não é mais o suficiente para indicar o tratamento oncológico. Para tanto, análises pormenorizadas de biomarcadores são necessárias, como as mutações, os receptores e outras moléculas que integram a carcinogênese e os mecanismos de resistência tumoral a diferentes drogas. Por exemplo, sem o conhecimento dos subtipos moleculares do câncer de mama, reconhecidos pela expressão de certos biomarcadores, entre os quais, o receptor de estrógeno (RE), o receptor

de progesterona (RP) e o receptores de fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), é impossível na atualidade tratar adequadamente as pacientes com este tipo de câncer. No câncer de pulmão, sem o estudo de painéis de mutações que incluem as dos genes *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) e *ALK* (*ALK receptor tyrosine kinase*) não se determina a terapêutica.

No caso da imunoterapia para o câncer de ovário seroso de alto grau não há validação de biomarcadores como preditivos de resposta, prognósticos e/ou validados para a indicação de drogas específicas. Isto também ocorre para os biomarcadores PD-1, PD-L1 e CD8, além da instabilidade microssatélite (MSI), reconhecidos como marcadores úteis na indicação de imunoterapia em outros tipos de câncer. O melhor entendimento e análise destes marcadores em câncer de ovário seroso pode contribuir para o uso dos imunoterápicos como possibilidade de tratamento.

2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico do câncer de ovário costuma ser realizado tardiamente pela dificuldade de associação dos sintomas com esta doença. Isto reduz as possibilidades de cura e denota a importância do entendimento da sua biologia e genética para melhor decisão terapêutica. O alto grau de heterogeneidade molecular e a expressão de neo-antígenos variados dependendo do subtipo tumoral envolvido (Mouw *et al.*, 2017; Pawlowska *et al.*, 2018) atrasam o progresso na terapêutica contra esta neoplasia maligna. A dificuldade de detectar o câncer de ovário precocemente é o principal fator relacionado ao desfecho desfavorável nestas pacientes, mesmo quando submetidas à melhor cirurgia

A imunoterapia pode ser uma alternativa de tratamento e está bem consolidada na terapêutica para câncer de pulmão e melanoma (Reck *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2017). Aprovações mais recentes ocorreram para câncer de bexiga, cólon, colo de útero e mama (Fader *et al.*, 2016; Schmid *et al.*, 2018; Powles *et al.*, 2020; Andre *et al.*, 2020).

Estudos pré-clínicos, de fase I, II e III estão sendo conduzidos com imunoterapia para câncer de ovário, mas ainda sem comprovação para os inibidores de PD-1 e PD-L1 serem utilizados como tratamentos efetivos associados ou não às terapias vigentes como quimioterapia, anti-VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e/ou inibidores de PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*).

Para a otimização desta alternativa de tratamento em câncer de ovário, sobretudo para os resistentes e refratários à platina, que levam a óbito em torno de um ano, e os sensíveis à platina, que em 95% dos casos recaem, é necessário compreender melhor os marcadores de imunoterapia e os preditores de resposta especialmente nos tumores epiteliais serosos de ovário.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O câncer de ovário

O câncer de ovário é uma neoplasia maligna grave que incide principalmente em mulheres na pós-menopausa (Torre *et al.*, 2018). Há dados insuficientes sobre a menopausa em populações latino-americanas, as quais diferem em estilo de vida e hábitos reprodutivos daquelas de países desenvolvidos. São poucos os estudos populacionais abordando a média de idade da menopausa das brasileiras. Não obstante, esta média foi calculada em 51,2 anos, com 60% das mulheres apresentando menopausa antes dos 52 anos, 5,5% antes dos 40 anos (menopausa precoce) e 2% acima de 55 anos (menopausa tardia) (Pedro *et al.*, 2003).

No Brasil, o câncer de ovário ocupa a sétima posição em incidência entre os tipos de câncer que acometem as mulheres. Corresponde à terceira neoplasia feminina mais comum nas mulheres, precedido pelo câncer de mama e de colo de útero (INCA, 2020). Outros tipos de câncer ginecológico de menor incidência são: câncer de endométrio, câncer de vulva, câncer de vagina e a neoplasia trofoblástica gestacional (INCA, 2020). Nos EUA, o câncer de ovário corresponde ao segundo tumor ginecológico mais comum e se constitui na principal causa de morte por esta categoria de câncer (Lheureux *et al.*, 2019). De acordo com dados do *The Global Cancer Observatory*, o câncer de ovário é a segunda neoplasia maligna ginecológica mais incidente, responde por mais mortes femininas logo depois do câncer de colo de útero e apresenta uma proximidade preocupante entre a incidência e o número de mortes a cada 100 mil habitantes, na maioria dos países do mundo (Globocan 2020).

Os fatores de risco para o câncer de ovário incluem envelhecimento, obesidade, endometriose (Králíčková *et al.*, 2019), histórico familiar de câncer de ovário, de mama ou colorretal, sobretudo em consanguíneos de primeiro grau (Shin *et al.*, 2018), e predisposição herdada para esta doença composta por mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* (*BRCA1 DNA repair associated*) e ou *BRCA2* (*BRCA2 DNA repair associated*) (Ebell *et al.*, 2016).

Na abordagem atual da paciente com câncer de ovário, é recomendado realizar o estudo de mutações somáticas e germinativas nestes dois genes, com escopo de indicação de drogas para o tratamento, de previsão de sensibilidade a estas drogas e de aconselhamento genético (Madariaga *et al.*, 2019). Entre as portadoras de mutação em *BRCA1*, 45-60% desenvolvem câncer de ovário. Consideradas as portadoras de mutação em *BRCA2*, 11-35% são acometidos por este tipo de câncer (Amendola e Vieira, 2005). As pacientes portadoras de mutações hereditárias que predispõem a elevado risco de câncer de ovário e/ou de mama devem receber orientação sobre estratégias redutoras de risco, como ooforectomia e/ou mastectomia profiláticas (NCCN, 2021).

Por outro lado, são fatores de redução do risco de câncer de ovário: multiparidade, amamentação, laqueadura tubária, uso de contraceptivos orais e salpingooforectomia bilateral (Goff, 2004; La Vecchia, 2017).

O diagnóstico do câncer de ovário é complexo devido à dificuldade de associar, especialmente nos estádios mais precoces, os sintomas – dor abdominal difusa ou dor pélvica crônica, mudanças de hábito intestinal e/ou urinário, distensão abdominal pós-prandial – com a doença (Roett *et al.*, 2009). Em casos mais avançados, é possível observar aumento do volume abdominal, massa abdominal ou pélvica palpável, ascite e emagrecimento. Geralmente são meses com os sintomas até a lembrança desta possibilidade diagnóstica pelos médicos (Ebell *et al.*, 2016).

Associados ao quadro clínico, os exames complementares são fundamentais para a realização do diagnóstico do câncer de ovário, entre os principais estão os exames laboratoriais, como a dosagem sanguínea do marcador tumoral Ca-125 e o antígeno carcinoembrionário (CEA), e os exames de imagens.

O Ca-125, igualmente conhecido como mucina 16 ou MUC16, é uma glicoproteína de membrana da família das mucinas, codificada pelo gene homônimo *MUC16* (*mucin 16, cell surface associated*). O teste desta proteína apresenta baixa sensibilidade nos estádios iniciais do câncer de ovário e baixa especificidade, com aumento de seus níveis em certas condições não-oncológicas, como menstruação, pancreatite, cirrose hepática, doença inflamatória pélvica e endometriose. Este marcador tumoral está superexpresso em ~80% dos casos de câncer epitelial de ovário. Entretanto, o Ca-125 correlaciona-se sobretudo com o monitoramento de resposta ao tratamento e a recorrência de doença, podendo estar aumentado até 4,8 meses antes da observação clínica da recorrência (Jacobs *et al.*, 1989; Moss *et al.*, 2005).

Compreendem os exames de imagens para o diagnóstico de câncer de ovário: tomografia axial computadorizada (TAC) de tórax, TAC de abdômen e pelve e/ou ressonância magnética nuclear (RMN) de abdômen e pelve, os quais avaliam a extensão da doença e possíveis metástases para pulmão, fígado, linfonodos abdominais, infiltração de cólon e/ou bexiga, além da carcinomatose peritoneal. Metástases para o sistema nervoso central são raras, mas podem ocorrer e são principalmente manifestações tardias da doença (Chen *et al.*, 2011). Não é rotina solicitar no estadiamento a RMN de crânio (Kumar *et al.*, 2015).

Nestas imagens de estadiamento, ainda é possível determinar a viabilidade cirúrgica, que pode ser medida pelo índice de Fagotti, um dos mais utilizados com este fim.

Ele dimensiona a carcinomatose peritoneal e o acometimento do diafragma, mesentério, omento, intestino, estômago e fígado (Fagotti *et al.*, 2016; Fleming *et al.*, 2018).

Além do índice de Fagotti, são empregados o índice de carcinomatose peritoneal (PCI) e o escore de citorredução completa (*completeness of cytoreduction score*, CCS0), os dois desenvolvidos para câncer gastrointestinal, em 1996, por Jacquet e Sugarbaker, e depois validados para câncer de ovário (Gouy *et al.*, 2013). O PCI é um fator indicador prognóstico de ressecabilidade em câncer de ovário e o mais preciso para descrever carcinomatose peritoneal. Isto porque estabelece treze regiões abdominopélvicas e descreve minuciosamente as zonas acometidas (Lampe *et al.*, 2015).

A RMN de abdômen e pelve com difusão é o melhor método para avaliar a lesão pélvica e a doença peritoneal em detrimento de ultrassom, tomografia ou tomografia por emissão de pósitrons (PETCT) (Sohaib *et al.*, 2007; Prakash *et al.*, 2010).

No entanto, nos últimos 5 anos, o PETCT oncológico tem sido utilizado mais especificamente para o estadiamento e a avaliação de recorrência (Cengiz *et al.*, 2019). A recorrência do câncer de ovário ocorre em 75% dos casos na cavidade peritoneal e em linfonodos retroperitoneais (Gadducci *et al.*, 2007). A detecção precoce da recorrência é importante por sua relação com o prognóstico e a escolha do tratamento (Pignata *et al.*, 2017). O PETCT é um método não invasivo, acurado e de alta sensibilidade, entre 80-100% (Kim *et al.*, 2007), para detectar recorrência do câncer de ovário (Pannu *et al.*, 2004). Este método pode detectar a recorrência deste tipo de câncer até 6 meses antes da tomografia computadorizada de abdômen e pelve.

Quanto ao rastreamento populacional do câncer de ovário, não há evidências robustas de sua utilidade para diagnóstico e, portanto, ele não é recomendado na prática clínica (Torre *et al.*, 2018; Lowry *et al.*, 2017). No entanto, detectar o mais precocemente

possível esta neoplasia maligna é fundamental para aumentar a sobrevida das pacientes e a possibilidade de cura.

3.2 Classificação do câncer de ovário

O carcinoma epitelial de ovário consiste no subtipo de câncer de ovário mais comum e corresponde a um extenso grupo de neoplasias malignas que tipicamente ocorrem nos ovários, trompas de Falópio e peritônio. Estas neoplasias podem ser reunidas segundo os prováveis sítios de origem, ovário ou tubas (Yang *et al.*, 2017).

Os tumores que têm origem no ovário compreendem as seguintes histologias: carcinoma seroso de alto grau (*high-grade serous pelvic carcinoma* ou HGSC, antes conhecidos como carcinoma seroso papilar), carcinoma seroso de baixo grau, carcinoma endometrióide, carcinoma mucinoso, carcinoma de células claras e *borderline* (Partridge *et al.*, 1999).

Estes tumores com origem no ovário constituem duas doenças distintas, com vias de carcinogênese diferentes, e seguem o modelo dualístico do carcinoma epitelial de ovário tipo I (carcinoma seroso de baixo grau) e tipo II (carcinoma seroso de alto grau), este último com maior instabilidade genética, maior agressividade clínica e diagnóstico em estádios mais tardios (Kurman *et al.*, 2014).

Histologicamente o que os diferencia é o grau de atipia – alterações nos padrões das células e dos núcleos celulares no tecido ovariano e/ou tuba – e o número de mitoses observadas nestes tecidos. As principais características morfológicas dos carcinomas serosos de alto grau são necrose, atipia moderada a intensa e mais de 12 mitoses por 10 campos de grande aumento (Kurman *et al.*, 2014).

Quanto ao perfil imunoistoquímico, estes dois tipos de carcinoma expressam a proteína supressora tumoral WT1 (*Wnt family member 1*). A esta proteína é atribuída a função de formar uma barreira de proteção para as células epiteliais contra patógenos. A sua expressão é considerada normal nas trompas de falópio e células da granulosa dos ovários. Por outro lado, os níveis elevados de WT1 têm sido associados a desfechos desfavoráveis em câncer, entre os quais os carcinomas de ovário (O'Neill *et al.*, 2005).

A proteína p53, codificada pelo gene supressor tumoral *TP53* (*tumor protein p53*), regula a expressão de diversos genes em resposta a diferentes tipos de estresse celular, induzindo a interrupção do ciclo celular, a apoptose, a senescência celular, o reparo do DNA e alterações no metabolismo. A expressão de p53 está alterada nos carcinomas de alto grau, apresenta-se completamente negativa ou difusamente positiva e superexpressa. Neste último caso, a proteína encontra-se mutada (Marks *et al.*, 1991; Skilling *et al.*, 1996). Mutações no gene *TP53* são consideradas características definidoras do carcinoma seroso de alto grau e ocorrem em 96% destes casos (Chiesa-Vottero *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2010; Szabova *et al.*, 2012).

A expressão do receptor de estrógeno (RE) e do receptor de progesterona (RP) está reduzida ou ausente nos carcinomas serosos de alto grau. O RE nuclear apresenta-se em duas formas, alfa e beta. A forma alfa promove a proliferação celular a partir do estímulo do 17 β -estradiol, de expressão elevada na mama e endométrio. O subtipo beta favorece a depuração celular e é expresso nas células ovarianas normais e em câncer de mama, cólon e próstata. O RP, ou NR3C3, é nuclear e ativado pela progesterona (Gadkar-Sable *et al.*, 2005). A expressão positiva de RE e RP é observada em tumores bem diferenciados (Dahlman-Wright *et al.*, 2006).

Para o carcinoma seroso de alto grau foi proposta uma classificação molecular em diferenciado, imunorreativo (o de melhor prognóstico), mesenquimal (o de pior prognóstico) e proliferativo (Verhaak *et al.*, 2006).

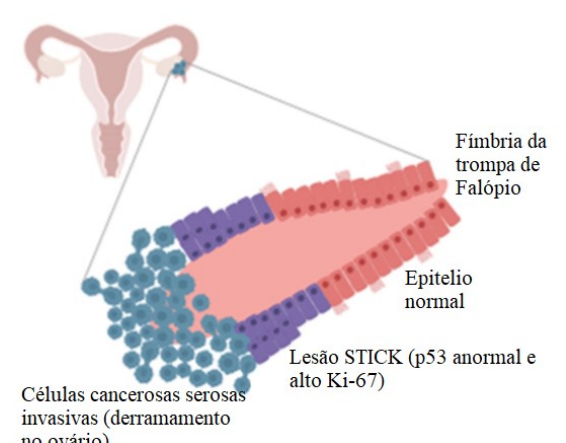
A origem dos carcinomas serosos de alto grau é controversa. Dados de pacientes portadoras de mutações nos genes *BRCA1/2* submetidas à salpingooforectomia profilática sugerem que estes carcinomas classificados como ovarianos ou peritoneais têm sua origem na tuba (Colombo *et al.*, 2019). O protótipo precursor da lesão seria o carcinoma intraepitelial seroso da tuba (*serous tubal intraepithelial carcinoma* ou STIC) (Medeiros *et al.*, 2006), que é repetidamente detectado na porção distal da tuba e fimbria e apresenta alta frequência de mutações em *TP53* (Kindelberger *et al.*, 2007) (Figura 1).

O risco de detecção do STIC na salpingectomia de mulheres portadoras de mutações nos genes *BRCA1/2* é de 1/20 mulheres. Este risco na população geral varia de 1/874 a 1/131. O risco do carcinoma intraepitelial seroso da tuba evoluir para carcinoma invasivo é de 5% (Colombo *et al.*, 2019).

A carcinomatose peritoneal consiste no carcinoma seroso do peritônio ou carcinoma seroso peritoneal e histologicamente é indistinguível do carcinoma seroso de ovário. A condição que a difere do carcinoma de ovário é a ausência do envolvimento ovariano, ausência STIC, ou o envolvimento extraovariano é maior que o ovariano (Colombo *et al.*, 2019). O câncer primário do peritônio é considerado o equivalente aos estádios III e IV do câncer de ovário.

A carcinomatose peritoneal de ovário é extremamente rara e indistinguível no pré-operatório, mesmo com os exames de imagem mais modernos. Caracteristicamente acomete mulheres mais velhas e tem sobrevida menor que o carcinoma seroso de ovário (Gao *et al.*, 2016).

Figura 1. Representação do desenvolvimento do carcinoma seroso de alto grau.



Legenda: Carcinoma seroso de alto grau. Desenvolvimento desde carcinoma intraepitelial seroso da tuba (*serous tubal intraepithelial carcinoma* ou STIC) até carcinoma seroso de alto grau.

Fonte: adaptado de Lheureux *et al.*, 2019.

3.3 Estadiamento do câncer de ovário

A classificação do câncer de ovário é feita com base no seu estágio de desenvolvimento (Quadro 1). Este processo de classificação é chamado de *estadiamento* e é realizado por meio de um sistema universalmente conhecido como TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*). No estadiamento atual do câncer de ovário, os critérios e as recomendações consideradas são os preconizados pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2021), *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN, 2021) e *International Federation of Obstetrics and Gynecology* (FIGO, 2021).

O estadiamento da paciente é realizado inicialmente com exames de imagem para avaliar radiologicamente tórax, abdômen e pelve. O estadiamento continua no intraoperatório pela exploração cirúrgica da cavidade abdominal e termina na análise anatomopatológica das peças cirúrgicas retiradas. Este mesmo estadiamento serve para câncer de ovário, câncer das trompas de Falópio e câncer peritoneal.

Quadro 1. Estadiamento clínico para tumores de ovário.

Estádios	Características
I (T1N0M0)	Tumor limitado ao ovário (s) ou tubas uterinas.
IA (T1aN0M0)	Tumor limitado a um ovário e dentro do ovário ou tuba uterina. Líquido abdominal ou pélvico sem células malignas.
IB (T1bN0M0)	Tumor envolvendo os dois ovários ou as 2 tubas uterinas. Líquido abdominal ou pélvico sem células malignas.
IC (T1cN0M0)	Tumor (cápsula) rompeu durante a cirurgia (IC1). Tumor no estágio IA ou IB, mas com tumor na superfície de pelo menos um ovário ou tuba uterina (pode ser por rompimento do tumor antes da cirurgia) (IC2). Presença de ascite ou lavado peritoneal com células neoplásicas presentes (IC3).
II (T2N0M0)	Tumor com extensão à pélvis (acometimento do útero, bexiga, colón sigmoide ou reto) ou primário do peritônio.
IIA (T2aN0M0)	Tumor com extensão e/ou metástases para útero e/ou tuba uterina.
IIB (T2bN0M0)	Tumor com extensão para outros tecidos pélvicos (bexiga, colón sigmoide e reto).
III	Tumor com implantes além da pélvis e/ou linfonodos intra-abdominais comprometidos.
IIIA1 (T1/T2N1M0)	Linfonodos comprometidos e/ou disseminação peritoneal microscópica além da pélvis (linfonodos retroperitoneais, pélvicos e ou para-aórtico exclusivamente).
IIIA2 (T3aN0/N1M0)	Crescimento de câncer além da pelve. Durante a cirurgia, câncer não é visível no abdômen, mas pequenos depósitos são documentados pela análise laboratorial da coleta de material (T3a).
IIIB (T3bN0/N1M0)	Tumor em um ou nos dois ovários com implante peritoneal extrapélvico ≤ 2 cm.
IIIC (T3cN0/N1M0)	Tumores com implantes peritoneais > 2 cm e/ou linfonodos inguinais ou pélvicos/retroperitoneais positivos. Pode haver implante no fígado e ou baço
IV (qualquer T, qualquer N, M1)	Tumor com metástases à distância.
IVA (qualquer T, qualquer N, M1a)	Derrame pleural com citologia positiva.
IVB (qualquer T, qualquer N, M1b)	Metástases para parênquima hepático ou esplênico. Metástases para órgãos extra-abdominais, incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal. Ou órgãos fora da cavidade abdominal como pulmão ou ossos.

Fonte: Adaptado de AJCC e FIGO, 2021.

3.4 Marcadores de instabilidade de microssatélite

Os estudos com famílias de portadores da Síndrome de Lynch que desenvolvem adenocarcinoma colorretal em idades inferiores a 45 anos chamaram atenção para o fato de não portarem, na linhagem germinativa, alterações em genes conhecidos da carcinogênese colorretal.

Porém, apresentavam erros de replicação do DNA que revelaram referir-se à perda funcional de genes de reparo de DNA conhecidos como constituintes da família MMR (*mismatch repair*): *MLH1* (*mutL homolog 1*), *MSH2* (*mutS homolog 2*), *MSH6* (*mutS homolog 6*), *PMS2* (*post meiotic segregation increased 2*) e *MLH3* (*mutL homolog 3*) (Sehgal *et al.*, 2014).

Mutações, incluindo deleções, herdadas ou somáticas, nos dois alelos de qualquer um destes genes leva ao comprometimento do mecanismo de reparo genômico durante o processo de replicação do DNA na fase S do ciclo celular. Isto confere à célula elevada propensão ao acúmulo de mutações. Esta falha pode ser detectada pela investigação da instabilidade de microssatélites (MSI ou *microsatellite instability*), facilmente estudada em exame de imunoistoquímica, entre outros (Richman, 2015).

Microssatélites são regiões pequenas do genoma onde os nucleotídeos encontram-se repetidos sequencialmente. Nestas regiões, os erros de replicação são mais facilmente reconhecidos, pois as repetições favorecem a ocorrência de mutações de ponto, além de pequenas deleções e inserções próximas das sequências de repetição. (Yamashita *et al.*, 2014).

Na prática clínica, os testes para detecção de instabilidade de microssatélite são feitos a partir de exames de imunoistoquímica do material proveniente do tumor. Na

maioria dos casos, a inativação dos dois alelos e consequente ausência de expressão da proteína correspondente é somática e ocorre em fase precoce da carcinogênese. A principal causa é a metilação do promotor de qualquer um dos genes de reparo, mas geralmente do *MLH1*. A deficiência na manutenção da estabilidade genômica facilita o acúmulo de mutações que influenciam no processo de carcinogênese.

O prognóstico para os tumores esporádicos que apresentam MSI é mais favorável. Estes tumores respondem melhor à imunoterapia (Popat *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2018) e a presença de MSI é considerada marcadora e preditora de resposta à imunoterapia (Marabelle *et al.*, 2020) (Gatalica *et al.*, 2016). A MSI também é estudada no câncer de ovário e é encontrada em aproximadamente 10% dos casos, na maioria, nos subtipos endometrióide e mucinoso (Marabelle *et al.*, 2020).

3.5 A imunoterapia e seus marcadores

O tratamento do carcinoma de ovário consiste em cirurgia de citorredução máxima, a qual inclui estadiamento da cavidade abdominal no peroperatório, histerectomia total com salpingooforectomia bilateral, dissecação dos linfonodos pélvicos e paraaórticos e omentectomia (Pomel *et al.*, 2007; Du Bois *et al.*, 2009). Esta cirurgia pode ser seguida ou não, conforme o estadiamento, de quimioterapia com carboplatina e paclitaxel (McGuire *et al.*, 1996; Du Bois *et al.*, 2009). Conhecida como *debulking*, esta cirurgia é o maior fator prognóstico para o aumento de sobrevida em todos os estádios do câncer de ovário (Openshaw *et al.*, 2015).

A quimioterapia clássica com platina apresentou poucas alterações nas últimas duas décadas. Associações de carboplatina ou cisplatina com outros quimioterápicos

(paclitaxel ou docetaxel), os conhecidos *doublers* de platina, além da doxorubicina lipossomal, têm sido as descrições consolidadas na literatura (Pignata *et al.*, 2011; Katsumata *et al.*, 2013). Aproximadamente 80% das pacientes respondem à platina em um primeiro tratamento (Cortez *et al.*, 2018).

Com o intuito de aumentar a efetividade do tratamento do câncer de ovário, diversos estudos com novas drogas isoladas ou em combinação têm sido realizados (Iwal *et al.*, 2017). Isto porque, mesmo com o tratamento padrão atual, incluindo cirurgia e quimioterapia, o prognóstico é devastador com sobrevida em 5 anos inferior a 5% (Gaillard *et al.*, 2016).

Em relação ao tratamento, os tumores de ovário podem ser classificados em:

- ✓ *resistentes e refratários à platina*, terminologia ainda muito utilizada, apesar das novas diretrizes considerarem esta definição como obsoleta e a substituírem pela descrição de câncer de ovário agnóstico (O'Malley *et al.*, 2021).

- ✓ *platino sensíveis* são aqueles com recidiva maior ou igual a 6 meses após o tratamento com platina na primeira linha;

- ✓ *platino resistentes* apresentam recidiva menor que 6 meses após o tratamento de primeira linha com platina;

- ✓ *platino refratários* apresentam progressão de doença durante ou em até 4 semanas após o tratamento com platina.

Nos últimos 10 anos, houve um incremento na terapia com as drogas anti-VEGF, como bevacizumab (Burger *et al.*, 2011), e os inibidores da enzima PARP, como olaparib, rucaparib, veliparib e niraparib, com aumento de sobrevida, o que gerou certo otimismo, apesar da persistência da gravidade e letalidade da doença (Moore *et al.*, 2018; Coleman *et al.*, 2019; González-Martín *et al.*, 2019).

Os inibidores de PARP acrescentaram significativo benefício em sobrevida livre de progressão e sobrevida global, quando usados em manutenção em primeira linha em pacientes com déficit de recombinação homóloga ou mutação em *BRCA1/2* (Pujade-Lauraine *et al.*, 2017). O “*Study 19*” demonstrou uma redução de 65% no risco de progressão ou de óbito com o uso do inibidor de PARP olaparib de manutenção em comparação com placebo no câncer de ovário recidivado sensível à platina (Ledermann *et al.*, 2012). Aproximadamente 15 a 20% dos tumores de ovário serosos têm mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e predizem melhor resposta à platina e aos inibidores da PARP (Pujade-Lauraine *et al.*, 2017).

Novas terapias que estimulam o sistema imune a elaborar uma resposta antitumoral têm sido desenvolvidas. A imunoterapia consiste de 2 mecanismos de ação: reverter a supressão imunológica ou estimular o sistema imunológico.

O estudo dos marcadores de imunoterapia tem evoluído nos diversos tipos de câncer, especialmente em melanoma e câncer de pulmão, inclusive sendo preditores de resposta ao tratamento imunoterápico nestas neoplasias malignas. Ainda não se tem evidência robusta para o câncer de ovário epitelial, daí o estudo intenso do microambiente tumoral deste tipo de câncer mensurando o impacto da expressão de marcadores como PD-1 (*programmed cell death 1* ou PDCD1), PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1* ou *CD274 molecule*) e linfócitos T CD8+, entre outros.

PD-L1 é uma proteína transmembrana de tipo I que apresenta domínios semelhantes aos domínios constante e variável das imunoglobulinas. Esta proteína está expressa em vários tipos celulares, incluindo células tumorais (Drakes *et al.*, 2018). A sua ligação com o seu receptor, PD-1, inibe a ativação das células T e a produção de citocinas. Durante a infecção ou a inflamação de tecidos normais, esta ligação PD-1/PD-L1 é

importante para prevenir autoimunidade pela manutenção da homeostase da resposta imunológica.

Nos microambientes tumorais, a ligação entre PD-L1 na célula tumoral e PD-1 no linfócito T permite que o tumor escape da resposta imune pela inativação de células T CD8⁺ citotóxicas. Assim, o bloqueio desta ligação por anticorpos específicos para PD-L1 ou PD-1 reverte este quadro e a célula T lisa a célula neoplásica porque passa a identificá-la como não-própria (Blank *et al.*, 2007).

A expressão de PD-L1 em células tumorais é considerada prognóstica em muitos tipos de câncer, entre os quais o câncer colorretal. Do mesmo modo, é um marcador válido para a imunoterapia, com maior especificidade para indicar a imunogenicidade dos tumores. Já o PD-1 pode promover a diferenciação de células T CD4⁺ em células T reguladoras e pode contribuir para a inibição da imunidade antitumoral e antimicrobiana eficaz (Buchbinder *et al.*, 2016).

Os padrões de expressão de PD-1 e PD-L1 podem ser avaliados por métodos imunoistoquímicos.

Os estudos têm revelado ainda a importância dos linfócitos que infiltram o tumor (*tumor infiltrating lymphocytes* ou TILS) como fator prognóstico em diversos tipos de câncer, por exemplo, em melanoma e câncer renal (Nakano *et al.*, 2001; Clemente *et al.*, 1996). Estes linfócitos, como os CD8⁺, penetram no tumor à medida que eles crescem e os reconhecem como células alteradas (Ravikumar Muthuswamy *et al.*, 2021).

O número de linfócitos CD8⁺ que infiltram o tumor prediz aumento de sobrevida em pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau (Goode *et al.*, 2017). Comumente, a densidade dos TILS tem classificado os tumores como quentes ou frios. Tumores que tem alto percentual de TILS, principalmente CD8⁺, são quentes ou imunogênicos. Pacientes

com tumores frios se tornam mais resistentes ao tratamento com imunoterápicos (Badoual *et al.*, 2013).

A resposta ao bloqueio do PD-1 está correlacionada à quantidade de TILS no microambiente tumoral. Quanto maior a quantidade de TILS, maior será a resposta imunológica. O melhor entendimento dos fatores que promovem a infiltração de linfócitos e a expressão de PD-L1 pelos tumores é fundamental neste contexto. Aparentemente os linfócitos T CD8⁺ também são essenciais para resposta aos imunoterápicos em carcinoma seroso de ovário de alto grau (Changxin *et al.*, 2020).

Entender o mecanismo molecular de exaustão da célula T CD8⁺ é necessário para estabelecer um racional para a imunoterapia. No cenário normal, a célula T tem seu processo de transição para quiescente, mas preserva sua capacidade efetora. Durante a progressão tumoral, a ligação antígeno-célula T específica mostra perda progressiva da sua função efetora e ausência da quiescência (Kurachi *et al.*, 2020). Esta exaustão é caracterizada, entre outros, pela co-expressão de altos níveis de receptores inibitórios, incluindo o PD-1. Bloquear a via do PD-1 pode reverter essa exaustão.

Por outro lado, a antigenicidade tumoral parece poder ser indicada pela carga mutacional tumoral (*tumor burden mutation* ou TMB) (Marabelle *et al.*, 2020).

A imunoterapia para o câncer epitelial de ovário tem sido estudada principalmente nos tumores resistentes à platina, mas não na carcinomatose peritoneal. A premissa para a utilização da imunoterapia no tratamento do câncer epitelial de ovário consiste na alta expressão de PD-L1 nas células deste tipo de câncer, frequentemente maior ou igual a 1% (Zhu *et al.*, 2017).

O *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do anticorpo específico para PD-L1 pembrolizumab para tumores sólidos com MSI elevada, em maio de 2015, baseado no estudo do Dung *et al.* (2015). Este imunoterápico anti-PD-L1 mostrou

atividade antitumoral durável com adequado manejo de toxicidade em pacientes com câncer de ovário avançado (*Clinical Trials.gov* NCT03740165). Estudos fase II com inibidores de PD-1, como o nivolumab, evidenciaram segurança e atividade antitumoral em pacientes com câncer de ovário seroso resistente à platina (Hamanish *et al.*, 2015; Pietzner *et al.*, 2018;). Outros estudos avaliaram a associação da imunoterapia aos inibidores de PARP e anti-VEGF (Suh *et al.*, 2018). Uma discussão mais recente é como tornar o câncer de ovário mais responsivo à imunoterapia (Pawlowska *et al.*, 2018).

Hoje, no câncer de ovário, existem pelo menos cinco ensaios clínicos randomizados de fase III que adicionam o bloqueio de PD-L1 à quimioterapia: 2 são com avelumab e 3 com atezolizumab.

O JAVELIN Ovarian 200 (NCT02580058) é o primeiro a comparar o avelumab sozinho ou em combinação com a doxorrubicina lipossomal peguilada em pacientes com câncer de ovário recorrente, trompa de Falópio ou peritoneal resistente à platina/refratário. O JAVELIN Ovarian 100 (NCT02718417) que avaliará a eficácia do avelumabe em combinação com a quimioterapia convencional carboplatina e paclitaxel em pacientes com câncer de ovário não tratado anteriormente.

Os outros 3 estudos com atezolizumabe envolvem a adição de quimioterapia e bevacizumabe (anti-VEGF) ao atezolizumabe. O estudo NCT02891824 avaliará a eficácia do atezolizumabe em combinação com bevacizumabe mais quimioterapia a base de platina em pacientes com câncer de ovário que apresentam recidiva sensível à platina (intervalo sem platina > 6 meses). O estudo NCT03038100 testará a atividade do atezolizumabe em combinação com bevacizumabe, paclitaxel e carboplatina em pacientes com câncer de ovário recém-diagnosticado. O estudo NCT02839707 combina atezolizumabe com bevacizumabe e doxorrubicina lipossomal peguilada no câncer de ovário resistente à platina. Da mesma forma, outro inibidor de PD-L1 durvalumabe e um inibidor de PD-1 em

combinação com quimioterapia também estão sendo testados em vários ensaios clínicos de fase I/II em câncer de ovário. Estes incluem durvalumab combinado com doxorrubicina lipossomal peguilada (NCT02431559) e pembrolizumab combinado com paclitaxel e carboplatina (NCT02520154) ou com paclitaxel de dose densa (NCT02440425).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a expressão imunoistoquímica de PD-1, PD-L1, CD8, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e p53 em amostras de pacientes com carcinoma seroso avançado de ovário.

4.2 Objetivos específicos

- a) Registrar características clínico-patológicas e revisar o diagnóstico histopatológico de pacientes com carcinoma seroso avançado de ovário;
- b) Avaliar a associação da expressão imunoistoquímica destes marcadores às características clínico-patológicas das pacientes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo de uma série de 28 casos de câncer de ovário de dois hospitais de Curitiba pela análise de prontuários médicos e da expressão tumoral de biomarcadores.

5.1 Pacientes e amostras

As amostras incluídas neste estudo retrospectivo procedem dos serviços de patologia de dois hospitais de Curitiba, Paraná – Hospital Santa Cruz e o Hospital Nossa Senhora das Graças –, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (2.022.676) e do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (2.131.666) (Anexos I e II).

Estas amostras tumorais foram obtidas durante os procedimentos cirúrgicos, no período de 2009 a 2020, para retirada de tumor primário de ovário de pacientes que não haviam sido submetidas à quimioterapia neoadjuvante.

Assim, foi estudada retrospectivamente uma amostra de conveniência constituída de 28 casos de pacientes com carcinoma seroso avançado de ovário, estágio clínico III ou IV (CID C56). Estes casos foram os que apresentaram blocos de parafina adequados ao estudo proposto e dados completos no prontuário. Foram excluídos por não atenderem estes critérios 12 casos.

5.2 Descrição das variáveis analisadas

Os dados das seguintes variáveis clínicas das pacientes e anatomopatológicas das amostras foram registrados e analisados a partir dos prontuários médicos:

- a) idade da paciente ao diagnóstico, em anos;
- b) etnia: branca, negra, amarela/índia, mista (parda/mulata); autodeclaração segundo os critérios do IBGE;
- c) índice de massa corpórea (IMC), calculado ao diagnóstico e classificado de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS): < 18,5 desnutrição, 18,5-24,9 eutrofia, 25-29,9 sobrepeso, 30-34,9 obesidade grau 1, 35-39,9 obesidade grau 2 e ≥ 40 obesidade grau 3 ou obesidade mórbida;
- d) diagnóstico: definido pelo resultado do exame anatomopatológico da peça cirúrgica;
- e) *performance status* através do ECOG (Oken MM *et al* 1982):
 - ✓ 0: Completamente ativa; capaz de realizar todas as suas atividades sem restrição (Karnofsky 90-100 %);
 - ✓ 1: Restrição a atividades físicas rigorosas; é capaz de trabalhos leves e de natureza sedentária (Karnofsky 70-80%);
 - ✓ 2: Capaz de realizar todos os autocuidados, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho; em pé aproximadamente 50% das horas em que o paciente está acordado (Karnofsky 50-60%);
 - ✓ 3: Capaz de realizar somente autocuidados limitados, confinado ao leito ou cadeira mais de 50% das horas em que o paciente está acordado (Karnofsky 30-40%);

- ✓ 4: Completamente incapaz de realizar autocuidados básico, totalmente confinado ao leito ou à cadeira (Karnofsky < 30%).

f) estadiamento oncológico pelo sistema TNM, onde T corresponde ao tamanho do tumor, N ao acometimento linfonodal e M a metástases à distância (AJCC, 2021);

g) estágio clínico: conforme Quadro 1, adaptado de AJCC, 2021.

h) histórico pessoal de câncer prévio;

i) presença de mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em material germinativo (sangue ou saliva) e/ou tumoral;

j) presença ou ausência de comorbidades associadas: refere-se a um contexto em que duas ou mais doenças que estão etiologicamente relacionadas; as doenças crônicas de base são as mais comuns: hipertensão arterial sistêmica, obesidade, diabetes *melitus*, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e dislipidemias em geral, doença arterial coronariana, doença cérebro vascular como acidente vascular cerebral, tireoidopatias (hipotireoidismo ou hipertireoidismo), doenças psiquiátricas;

k) recidiva: retorno da doença após intervalo livre de câncer;

l) sítio de recorrência: locorregional, linfonodal, peritônio, fígado, pulmões, sistema nervoso central;

m) sobrevida livre de recidiva: definida como o tempo entre remissão e recidiva da doença;

n) sobrevida global: definida como o período durante o qual um paciente permanece vivo após o diagnóstico da doença ou início do tratamento.

Os dados de sobrevida foram atualizados em novembro de 2021, quando foi realizada a análise estatística.

5.3 Análise histológica

Os padrões anatomopatológicos encontrados nas amostras deste estudo foram revisados em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (Harris Hematoxilina: NewProv, Cod. PA203, Paraná, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. 4371, Paraná, BR).

5.4 Testes imunoistoquímicos

A técnica de imunoistoquímica foi utilizada com a finalidade de determinar a imunoe expressão de PD-1, PD-L1, CD8, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e p53 em amostras de carcinoma seroso de ovário avançado.

5.4.1 PD-1, PD-L1, CD8 e p53

O ensaio de imunoistoquímica preconizou um protocolo de incubação dos anticorpos primários específicos para PD-1, PD-L1, CD8 e p53 (Tabela 1) em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, *overnight*. O polímero secundário – *Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer*, ab236466 Abcam, Cambridge, UK – foi aplicado no material testado por 25 minutos em temperatura ambiente. A revelação da técnica se deu com a adição do complexo 2,3, diaminobenzidina + substrato peróxido de hidrogênio, por tempos suficientes para o desenvolvimento da cor castanha, seguida de contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Os controles positivos para estas reações foram constituídos pela imunopositividade de amostras teciduais reconhecidamente reagentes para os anticorpos em teste. Estas amostras foram alocadas nas lâminas juntamente com as amostras estudadas. Foram analisadas amostras de linfonodos para CD8 e de carcinoma mamário para p53, juntamente com a reação das amostras testadas. O controle negativo foi constituído pela omissão da aplicação do anticorpo primário na reação.

Tabela 1. Características dos anticorpos empregados nos testes imunoistoquímicos.

Anticorpo	Especificações	Clone/Código	Marca	Diluição
anti-PD-1	monoclonal/ camundongo	J116/14-9989-82	Thermo Fisher	1:100
anti-PD-L1	policlonal/ coelho	PA5-28115	Thermo Fisher	1:200
anti-CD8	monoclonal/ coelho	SP16	Thermo Fisher	1:100
anti-MLH1	monoclonal/ camundongo	ES05	Dako	1:200
anti-MSH2	monoclonal/ coelho	FE11	Dako	pronto para uso
anti-MSH6	monoclonal/ coelho	EP49	Dako	pronto para uso
anti-PMS2	monoclonal/ coelho	EP51	Dako	pronto para uso
anti-p53	monoclonal/ camundongo	D07/BSB5844	BioSB	1:200

5.4.2 MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2

O ensaio de imunistoquímica preconizou um protocolo de incubação dos anticorpos primários específicos para MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (Tabela 1) em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, *overnight*. O polímero secundário – *Dako EnVision™ FLEX/HRP*, Santa Clara, CA – foi aplicado no material testado por 30 minutos em temperatura ambiente. A revelação da técnica se deu com a adição do complexo 2, 3, diaminobenzidina + substrato peróxido de hidrogênio, por tempos suficientes para o desenvolvimento da cor castanha, seguida de contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Os controles positivos para estas reações foram constituídos pela reatividade de amostras de tecido de cólon humano reconhecidamente reagentes para os anticorpos testados. Estas amostras foram alocadas nas lâminas juntamente com as amostras estudadas. O controle negativo foi constituído pela omissão do anticorpo primário na reação.

5.5 Análise da imunoexpressão tecidual

5.5.1 PD-L1

As lâminas imunomarcadas com anticorpo específico para PD-L1 foram escaneadas com o auxílio do *scanner* de lâminas Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Alemanha). Foram geradas 30 imagens em campo de grande aumento, 40X, pelo software ZEN Blue Edition (Zeiss, Jena, Alemanha).

As análises foram realizadas de modo cego, sendo as imagens obtidas de regiões amostrais aleatórias sem a interferência de um observador. Em cada imagem, foram medidas as

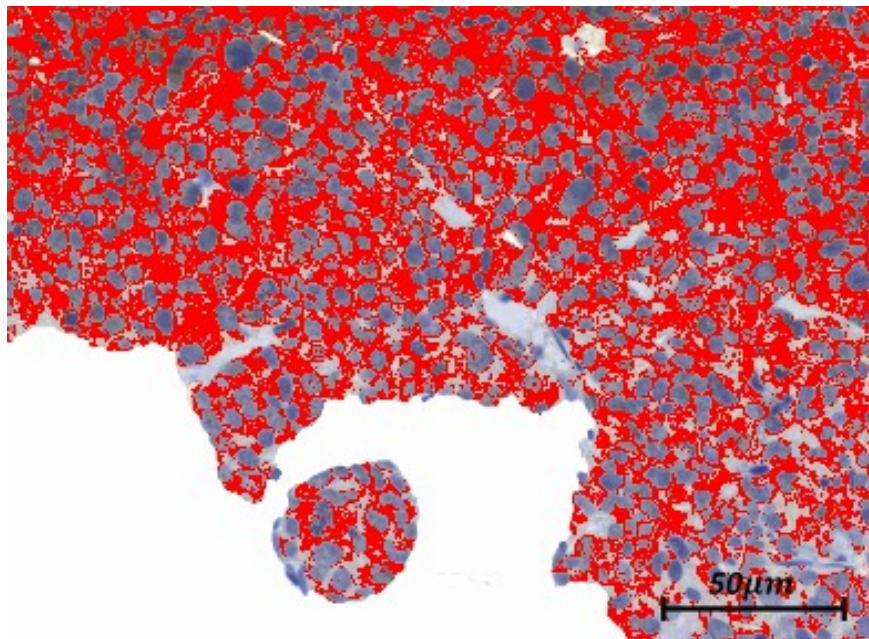
áreas de imunoexpressão pelo software Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD), através do emprego de um método de segmentação semiautomatizada por cores, no qual a área imunopositiva para PD-L1 foi delimitada e quantificada.

A seguir, o valor da área imunopositiva expresso em micrômetros quadrados (μm^2) foi dividido pelo valor total da área tumoral e transformado em um valor percentual, sendo expresso na seguinte fórmula matemática:

$$\text{valor percentual} = \left(\frac{\text{Área imunopositiva}}{\text{Área tecido total}} \right) \times 100.$$

Por fim, foram calculados os valores de média aritmética das imagens de cada paciente, de maneira que estes resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística (Figura 2).

Figura 2. Análise morfométrica de PD-L1.

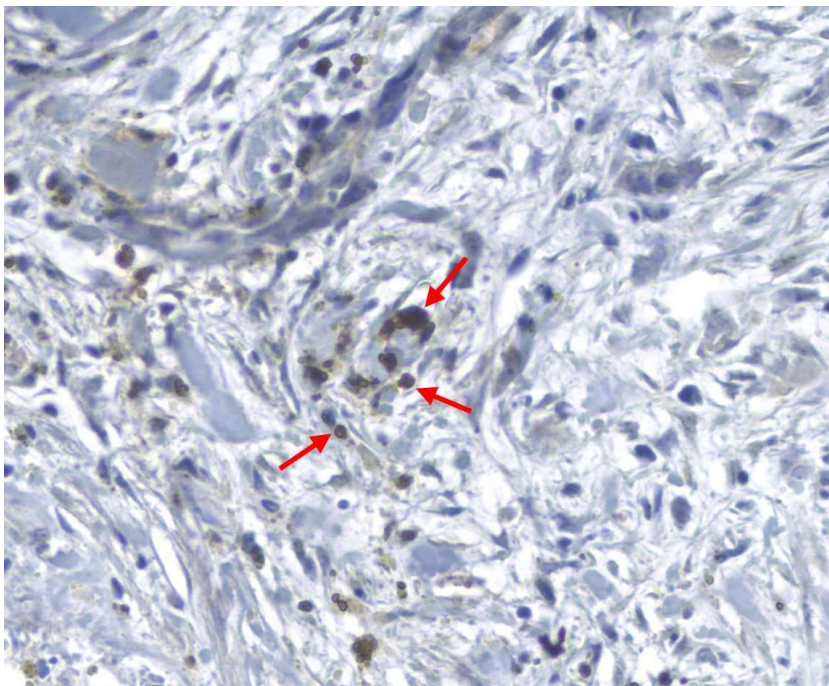


Legenda: Imagem da área imunopositiva para PD-L1 delimitada artificialmente (vermelho) com o auxílio do Programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD). Aumento de 40X. Amostra de tecido de um carcinoma seroso de alto grau.

5.5.2 CD8 e PD-1

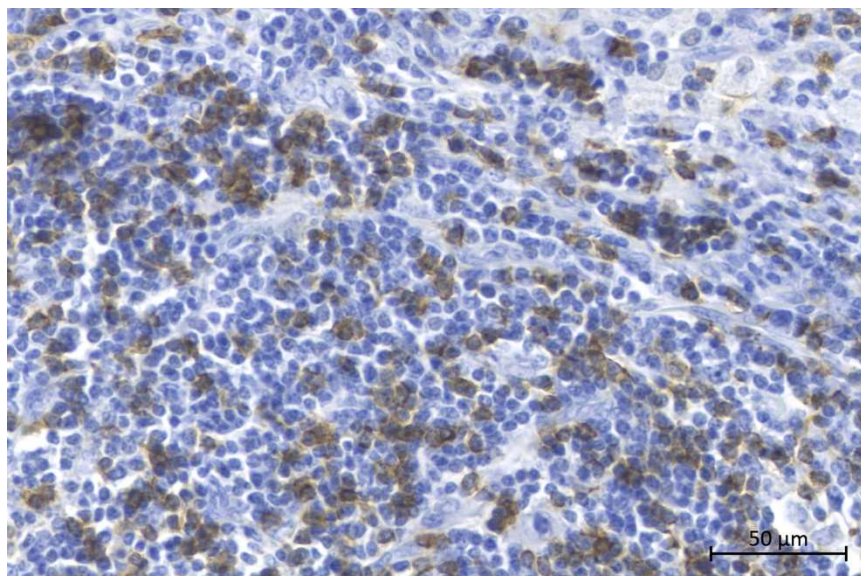
As lâminas imunomarcadas com anticorpos específicos para PD-1 (Figura 3) e CD8 (Figura 4) foram escaneadas com o auxílio do *scanner* de lâminas Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Alemanha), sendo os arquivos digitalizados visualizados pelo software ZEN Blue Edition (Zeiss, Jena, Alemanha). Com os recursos deste último, foi convencionado, virtualmente, um retângulo contendo 1mm² de área, o qual foi posicionado sobre regiões de *hotspot* (regiões com grande densidade de linfócitos). A seguir, foram realizadas contagens dos linfócitos imunomarcados com os respectivos anticorpos e os valores obtidos foram organizados em planilhas e posteriormente submetidos à análise estatística.

Figura 3. Análise de PD-1



Legenda: Fotomicrografia da imunoexpressão tecidual de PD-1 em amostra de carcinoma seroso de alto grau, representada pelas setas vermelhas.

Figura 4. Análise de CD8



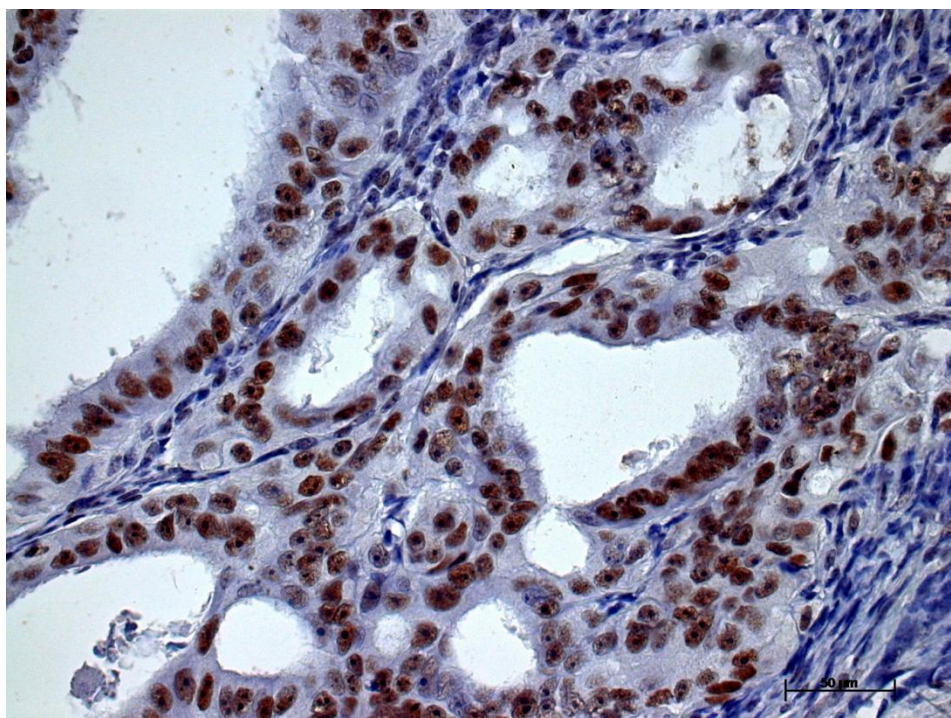
Legenda: Fotomicrografia da imunoexpressão tecidual de CD8 em amostra de carcinoma seroso de alto grau. As áreas em castanho correspondem aos linfócitos T CD8+ imunomarcados com o anti-CD8.

5.5.3 MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2

As lâminas imunomarcadas com anticorpos anti-MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS-2 foram analisadas no microscópio BX40® (Olympus, Tóquio, Japão), no aumento de 40X e pareadas na seguinte associação: MSH2 + MSH6 e MLH1 + PMS2. Cada amostra que compunha um caso foi analisada e a presença de ao menos uma área positiva classificou o caso como positivo e a ausência de qualquer área positiva o classificou como negativo para o anticorpo em questão.

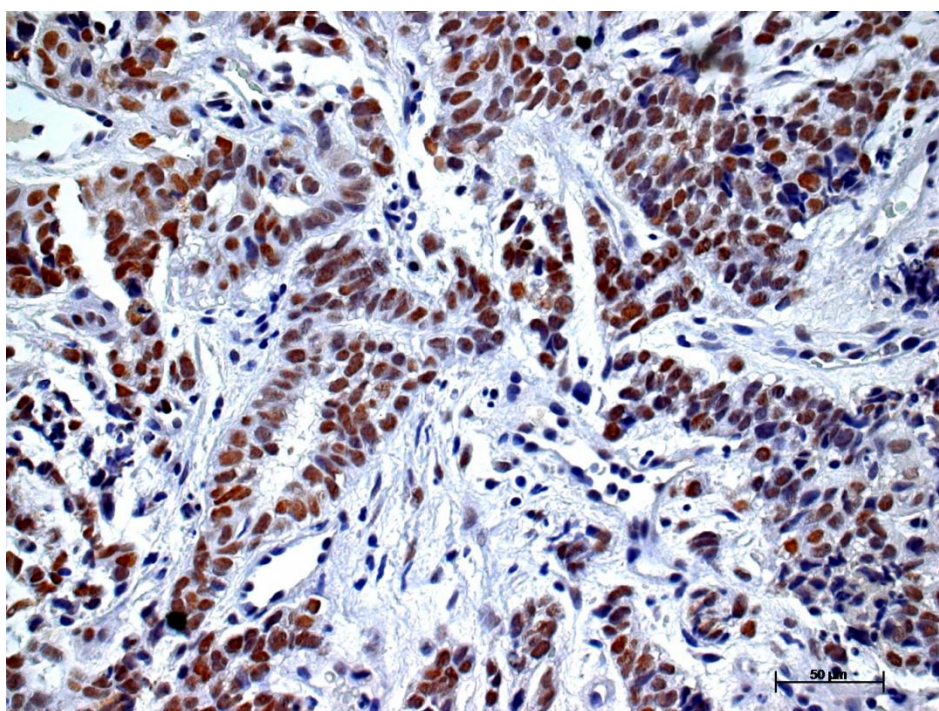
Os casos foram definidos como portadores de MSI quando pelo menos uma das 4 proteínas MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) foi negativa.

Figura 5. Análise de MLH1.



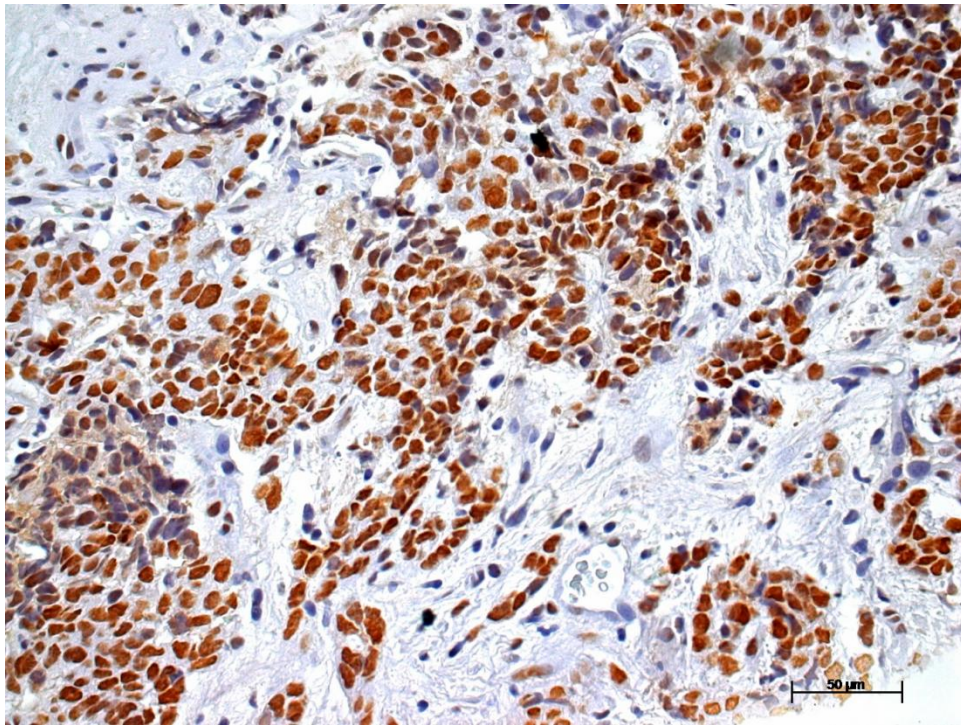
Legenda: Fotomicrografia mostrando coloração castanha nuclear que representa a imunopositividade tecidual para a reação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-MLH-1, demonstrando a presença da respectiva proteína em núcleos de células de carcinoma seroso papilífero de ovário.

Figura 6. Análise de MSH2.



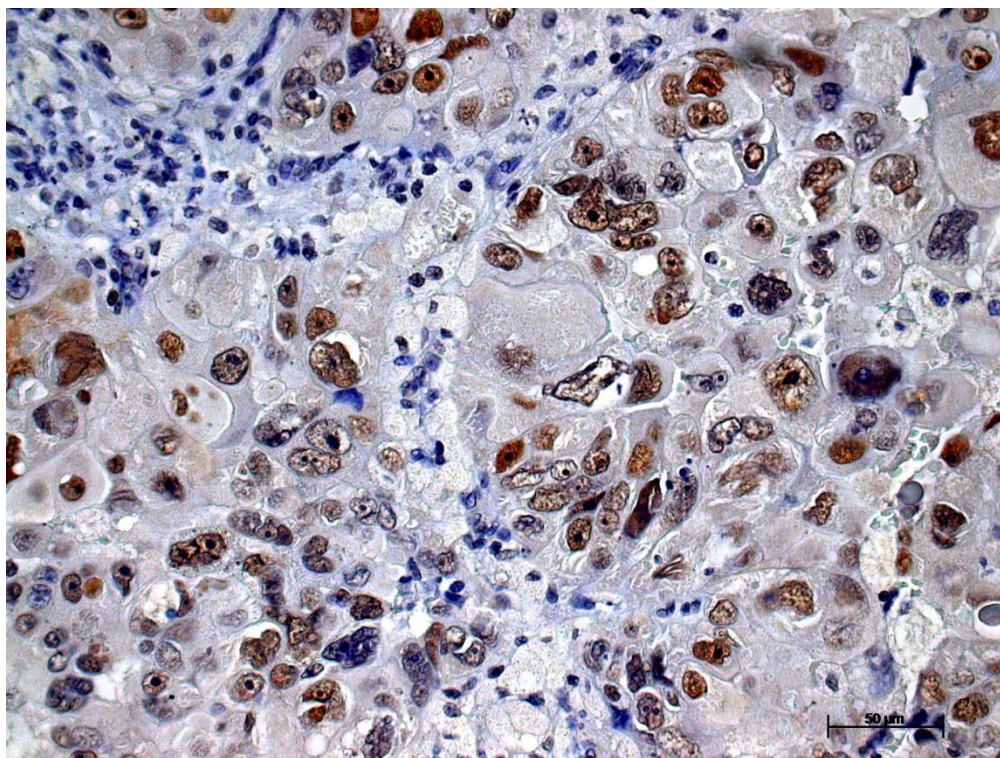
Legenda: Fotomicrografia mostrando coloração castanha nuclear que representa a imunopositividade tecidual para a reação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-MSH-2, demonstrando a presença da respectiva proteína em núcleos de células de carcinoma seroso papilífero de ovário.

Figura 7. Análise de MSH6.



Legenda: Fotomicrografia mostrando marcação castanha nuclear que representa a imunopositividade tecidual para a reação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-MSH6, demonstrando a presença desta proteína em núcleos de células de carcinoma seroso papilífero de ovário.

Figura 8. Análise de PMS2.

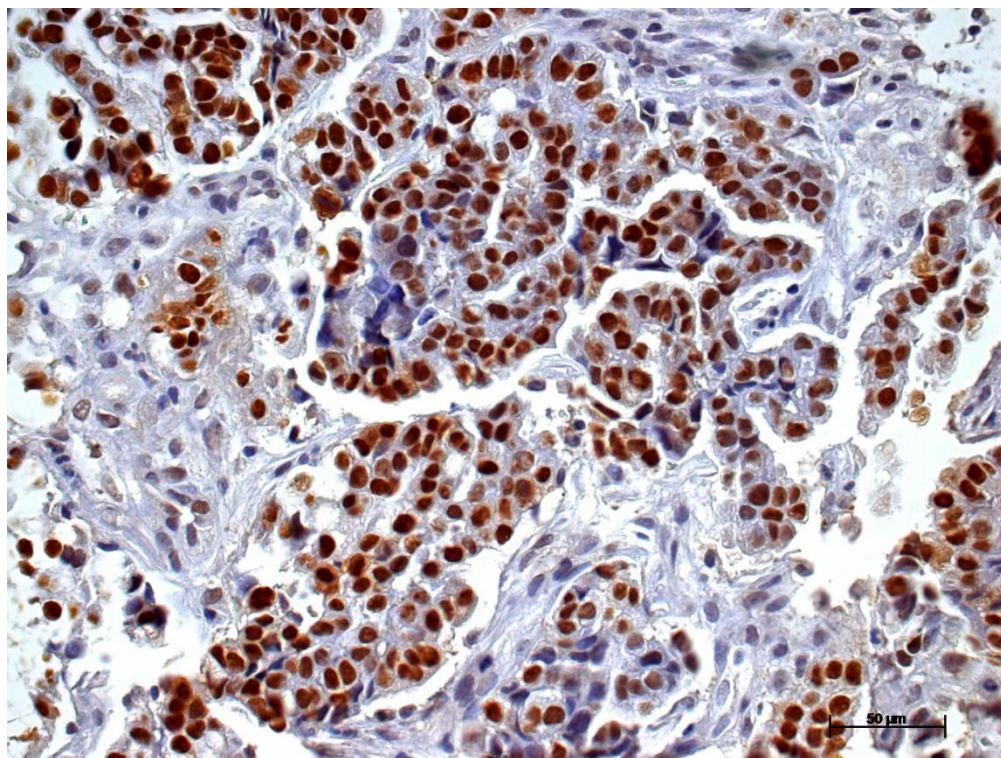


Legenda: Fotomicrografia mostrando marcação castanha nuclear que representa a imunopositividade tecidual para a reação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-PMS2, demonstrando a presença desta proteína em núcleos de células de carcinoma seroso papilífero de ovário.

5.5.4 p53

As lâminas imunomarcadas para p53 foram analisadas no microscópio BX40® (Olympus, Tóquio, Japão), no aumento de 40X. A expressão de p53 foi classificada em superexpressão (mutado) e *wild type* (não-mutado), nas amostras estudadas.

Figura 9. Análise morfométrica de p53.



Legenda: Fotomicrografia mostrando marcação castanha nuclear que representa a imunopositividade tecidual para a reação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-p53, demonstrando a presença desta proteína em núcleos de células de carcinoma seroso papilífero de ovário

5.6 Análise estatística

Resultados de variáveis quantitativas foram descritos por média, desvio padrão, mediana, mínimo, máximo e amplitude interquartílica. Variáveis categóricas foram descritas por frequência e percentual. A avaliação da correlação entre duas variáveis quantitativas foi feita estimando-se o coeficiente de correlação de Spearman. Para a comparação de dois grupos definidos por variáveis categóricas dicotômicas, em relação a variáveis quantitativas, foi usado o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A associação entre duas variáveis categóricas foi analisada usando-se o teste exato de Fisher. Para a análise de fatores associados ao tempo

livre de recidiva e tempo de sobrevida foi usado o modelo de Regressão de Cox e o teste de Log-rank. A condição de normalidade das variáveis quantitativas contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Stata/SE v.14.1. StataCorpLP, USA.

6 RESULTADOS

6.1 Características clínico-patológicas

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as estatísticas descritivas dos dados clínico-patológicos, quantitativos e categóricos, retirados dos prontuários das 28 pacientes com carcinoma epitelial seroso de ovário avançado (ECIII ou IV / CID C56). Em virtude da ausência de informações completas nos prontuários, em algumas variáveis, é observada diferença em relação ao número amostral.

Todas as pacientes se autodeclararam brancas. A média da idade ao diagnóstico foi de 61,3 anos; a paciente mais jovem tinha 34 anos e a mais velha, 90 anos. O IMC médio foi de 25,9, compatível com sobrepeso (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização clínico-patológica quantitativa das pacientes estudadas.

Variável	n*	Média $\pm$ DP	Mediana (mín. -máx.)	AIQ
Idade ao diagnóstico (anos)	28	61,3 $\pm$ 14	60 (34 - 90)	18
IMC	26	25,9 $\pm$ 5,8	25,2 (18,6 - 41,3)	6,3

Legenda: n: número de casos; DP: desvio padrão; mín: valor mínimo; máx. valor máximo; AIQ: amplitude interquartilica (diferença entre quartil 1 e quartil 3); IMC: índice de massa corpórea; *o número de casos é diferente nas variáveis devido a falhas de registro nos prontuários das pacientes.

A maioria das pacientes (60%) foi submetida a citorredução *versus* biopsia cirúrgica. A maioria das pacientes apresentou carcinoma epitelial seroso de alto grau (21/28; 75%). Todas as pacientes tinham estadiamento clínico III (19/27; 70%) ou IV (8/27;

29,6%). Os tumores eram T3 (24/25; 96%). Havia comprometimento de linfonodos em 15 pacientes (15/26; 57,7%) e 8 (8/26; 30,8%) exibiam metástase à distância (Tabela 3).

Sete pacientes relataram histórico pessoal de câncer, sendo três casos de câncer de mama. A maioria das pacientes não apresentava mutação em *BRCA1* (11/18, 61,1%) ou *BRCA2* (12/18, 66,7%), independente se mutação era germinativa ou tumoral (Tabela 3). Três pacientes exibiram mutações em *BRCA1* e *BRCA2*.

Comorbidades foram anotadas para 61% (16/26) das pacientes (Tabela 3). Três pacientes apresentaram hipotireoidismo (3/28; 11%), duas obesidade (2/28; 7%) e duas hipertensão (2/28; 7%).

O esquema de quimioterapia mais utilizado foi a combinação de carboplatina mais paclitaxel (75%) e a maioria dos carcinomas era sensível à platina (92%, 23/25) (Tabela 3). A sobrevida global média foi 50,8 meses e a sobrevida livre de progressão média foi de 17,2 meses. Quinze pacientes recidivaram (15/28; 53,6%) e seis (6/28; 21,4%) foram a óbito no período analisado (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização clínico-patológica categórica das pacientes estudadas.

Variável		n ¹	%
Diagnóstico ²	alto grau	21	75,0
	baixo grau	7	25,0
Tamanho do tumor	T3	24	96,0
	T4	1	4,0
Comprometimento de linfonodos	não	11	42,3
	sim	15	57,7
Metástase	não	18	69,2
	sim	8	30,8
Estádio clínico	III	19	70,4
	IV	8	29,6
Histórico pessoal de câncer	não	13	0,65
	sim	7	0,35
Mutação em <i>BRCA1</i>	não	11	61,1
	sim	7	38,9
Mutação em <i>BRCA2</i>	não	12	66,7
	sim	6	33,3
Tipo de mutação <i>BRCA</i>	germinativa	7	70,0
	tumoral	3	30,0
Comorbidade	não	10	38,5
	sim	16	61,5
Platina sensível	não	2	8,0
	sim	23	92,0
Recidiva	não	13	46,4
	sim	15	53,6
Desfecho	óbito	6	21,4
	viva	18	64,3
	perda de segmento	4	14,3

Legenda: n: número de casos; T3: tumor que acomete um ou os dois ovários e/ou tuba com doença microscópica confirmada fora da pelve e/ou metástase retroperitoneal (linfonodos pélvicos e/ou paraórticos); ¹o número de casos é diferente nas variáveis devido a falhas de registro nos prontuários das pacientes, ²corresponde ao diagnóstico patológico cirúrgico.

6.2 Perfis de expressão imunoistoquímica proteica tumoral

Os resultados da análise imunoistoquímica são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4. Expressão imunoistoquímica das proteínas PD-1, CD8, PD-L1.

Variável	n	Média $\pm$ DP	Mediana (mín. - máx.)	AIQ
PD-1	28	18,8 $\pm$ 17,2	15,5 (1 - 62)	25,5
CD8	28	346,6 $\pm$ 469,2	158,5 (16 - 1957)	440
CD8/PD-1	28	19,4 $\pm$ 22,2	11,5 (0,1 - 78,5)	31
PD-L1	26	15,2 $\pm$ 18,1	8,1 (0,5 - 72,4)	12,5

Legenda: n: número de casos; DP: desvio padrão; mín: valor mínimo; máx. valor máximo; AIQ: amplitude interquartilica (diferença entre quartil 1 e quartil 3).

Tabela 5. Expressão imunoistoquímica das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e p53.

Proteína		n*	%
MLH1	negativo	5	17,8
	positivo	23	82,2
MSH2	negativo	2	7,2
	positivo	26	92,8
MSH6	negativo	1	3,6
	positivo	27	96,4
PMS2	negativo	3	10,7
	positivo	25	89,3
p53	<i>wild type</i>	6	21,4
	superexpresso	22	78,6

Legenda: n = número de casos.

Tabela 6. Status de MSI nas amostras estudadas.

MSI	n	%
estável	23	85,2
instável	4	14,8

Legenda: n: número de casos.

6.3 Análise comparativa da expressão imunoistoquímica dos marcadores estudados e características clínico-patológicas das pacientes

O perfil de expressão de PD-L1 foi comparado ao perfil de expressão de PD-1 para investigar se apresentavam correlação. Esta análise mostrou que estes perfis não estão correlacionados ($r= 0,10$ e $p=0,642$).

Para verificar se os perfis de expressão de PD-1 e PD-L1 estavam associados ao grau do carcinoma seroso de ovário e ao estágio clínico, foram conduzidos testes Teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Não foi observada associação em nenhum destes casos (Tabela 7).

Tabela 7. Associação dos perfis de expressão de PD-1 e PD-L1 ao grau do carcinoma seroso de ovário e estágio clínico.

Marcador	Grau do carcinoma seroso				Estádio clínico			
		n	Média $\pm$ DP	p*		n	Média $\pm$ DP	p*
PD-1	alto	21	20,0 $\pm$ 15,0	0,172	III	19	18,7 $\pm$ 19,0	0,938
	baixo	7	16,0 $\pm$ 23,0		IV	8	18,6 $\pm$ 14,5	
PD-L1	alto	19	14,3 $\pm$ 18,6	0,364	III	18	16,7 $\pm$ 21,4	0,574
	baixo	7	17,4 $\pm$ 17,7		IV	7	11,0 $\pm$ 6,1	

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,05$.

O *status* de MSI foi comparado aos resultados de expressão de PD-1, PD-L1 e da relação CD8/PD-1. Houve uma maior proporção CD8/PDI nos casos com MSI estável ($p=0,049$) (Tabela 8).

Tabela 8. Associação do *status* de MSI à expressão de PD-1e PD-L1 e à proporção CD8/PD-1.

Marcador	MSI	n	média ± DP	p*
PD-1	estável	23	20,5 ± 18,2	0,272
	instável	4	8,0 ± 6,4	
CD8/PD-1	estável	23	19,6 ± 19,9	0,049
	instável	4	2,9 ± 3,2	
PD-L1	estável	22	15,1 ± 17,5	0,471
	instável	4	15,5 ± 24	

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, p<0,05.

Ainda, para verificar se o *status* de MSI estava associado ao grau do carcinoma seroso de ovário, ao estágio clínico ou à sensibilidade à platina, foram conduzidos testes exatos de Fisher. Não foi observada associação em nenhum destes casos (Tabela 9).

Tabela 9. Associação do *status* de MSI ao grau do carcinoma seroso de ovário, estágio clínico e à sensibilidade à platina

MSI	Grau do carcinoma seroso			Estádio clínico			Platina sensível		
	alto	baixo	p*	III	IV	p*	não	sim	p*
estável	16	7	0,545	16	6	1	2	18	1
instável	4	0		3	1		0	4	

Legenda: *teste exato de Fisher, p<0,05

Da modo semelhante, a expressão de p53 foi avaliada quanto à associação com o grau do carcinoma seroso de ovário e ao estágio clínico. Não foi observada associação em nenhum destes casos (Tabela 10).

Tabela 10. Associação da expressão de p53 ao grau do carcinoma seroso de ovário e estágio clínico.

p53	Grau do carcinoma seroso			Estádio clínico		
	alto	baixo	p	III	IV	p
superexpresso	17	5	0,287	16	5	0,548
wild type	2	2		2	2	

Legenda: teste exato de Fisher, $p < 0,05$

A eventual influência da idade ao diagnóstico na expressão dos marcadores estudados foi avaliada pela investigação de correlação entre esta variável e os perfis de expressão observados. Nenhuma correlação foi observada (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Correlação da idade ao diagnóstico em anos e a expressão de PD-1 e PD-L1.

Variáveis analisadas			n	r	p
idade	x	PD-1	28	-0,03	0,889
idade	x	PD-L1	28	0,16	0,432

Legenda: r: coeficiente de correlação de Spearman; $p < 0,05$.

Tabela 12. Associação da idade ao diagnóstico em anos e a expressão de p53.

p53	n	Idade (anos)	p*
		média $\pm$ DP	
super expresso	22	65,2 $\pm$ 13,7	0,456
wild type	4	70,8 $\pm$ 11,6	

*Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

Os impactos da idade ao diagnóstico, da expressão de PD-1 e PD-L1 e da proporção de CD8/PD-1, bem como da expressão de p53, do *status* de MSI, do estágio

clínico e do grau do carcinoma seroso, na recidiva (Tabelas 13 e 14) e no óbito (Tabelas 15 e 16) foram avaliados. A MSI impactou na sobrevida livre de recidiva neste estudo (Tabela 14; Figura 5). Não houve correlação significativa das variáveis estudadas com o óbito nesta amostra (Tabelas 15 e 16).

Tabela 13. Associação de recidiva e idade ao diagnóstico em anos, expressão de PD-1 e PD-L1 e a proporção de CD8/PD-1.

Variável	Recidiva	n	Descritivas	p*
Idade (anos)	não	13	66,8 ± 15,4	0,571
	sim	15	64,2 ± 13,2	
PD-1	não	13	16 (3 - 62)	0,263
	sim	15	8 (1 - 36)	
PD-L1	não	13	9 (3 - 55,4)	0,437
	sim	13	7,3 (0,5 - 72,4)	
CD8/PD-1	não	13	10,8 (1,1 - 77)	0,562
	sim	15	7,6 (0,1 - 43,4)	

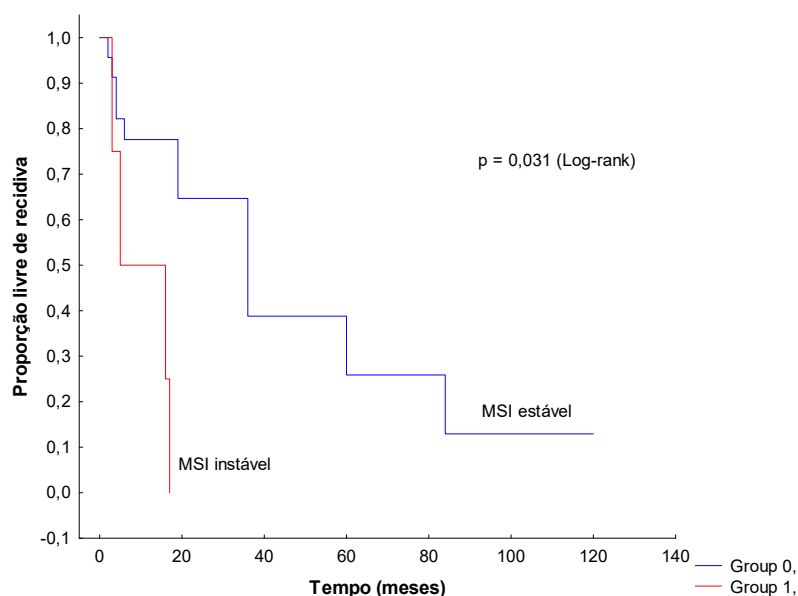
Legenda: *Modelo de Regressão de Cox, p<0,05

Tabela 14. Associação de recidiva expressão de p53, do *status* de MSI, do estágio clínico e do grau do carcinoma seroso.

Variável	n	% de recidiva	p*
p53	super expresso	22	12 (54,5)
	wild type	4	2 (50)
MSI	estável	23	10 (43,5)
	instável	4	4 (100,0)
Estádio clínico	III	19	9 (47,4)
	IV	8	6 (75,0)
Grau do carcinoma seroso	alto	21	13 (61,9)
	baixo	7	2 (28,6)

Legenda: *Teste de Log-rank, p<0,05.

Figura 10. Curva mostrando a diferença de recidiva entre as pacientes com diferentes *status* de MSI.



Legenda: *Teste de Log-rank, $p < 0,05$.

Tabela 15. Associação do óbito e idade ao diagnóstico em anos, expressão de PD-1 e PD-L1 e a proporção de CD8/PD-1.

Variável	Óbito	n	Descritivas	p*
Idade	não	20	65,9 ± 15,6	0,915
	sim	6	64,0 ± 8,3	
PD-1	não	20	7,5 (1 - 62)	0,624
	sim	6	17 (2 - 34)	
PD-L1	não	20	6,8 (0,48 - 72,4)	0,316
	sim	6	14,6 (6,7 - 51,3)	
CD8/PD-1	não	20	9,6 (0,12 - 77)	0,674
	sim	6	8,5 (1,1 - 43,4)	

Legenda: *Modelo de Regressão de Cox, $p < 0,05$

Tabela 16. Associação de recidiva expressão de p53, do *status* de MSI, do estágio clínico e do grau do carcinoma seroso.

	Variável	n	Óbitos (%)	p*
p53	super expresso	22	5 (22,7)	0,736
	<i>wild type</i>	4	1 (25,0)	
MSI	estável	23	5 (21,7)	0,739
	instável	4	1 (25,0)	
Estádio clínico	III	19	3 (15,8)	0,504
	IV	8	3 (37,5)	
Carcinoma seroso	alto grau	21	4 (19,0)	0,194
	baixo grau	7	2 (28,6)	

Legenda: *Teste de Log-rank, $p < 0,05$

7 DISCUSSÃO

O prognóstico do câncer de ovário avançado é muito ruim. Em 5 anos após o diagnóstico, em torno de 20% das pacientes estão vivas (Drakes *et al.*, 2018). A terapia padrão com quimioterapia não tem sido suficiente nos estádios mais avançados mesmo com a citorredução completa. A elevada letalidade do câncer de ovário é fato e requer urgência para terapias efetivas com ganhos maiores na sobrevida global para as pacientes.

Ainda, a maioria das pacientes recorre e desenvolve resistência à quimioterapia, principalmente à carboplatina e à cisplatina (agentes platinantes de primeira escolha), entre 16 e 18 meses de tratamento (Cortez *et al.*, 2018). Os dados deste estudo revelaram uma sobrevida livre de progressão de 17,2 meses, compatível com a literatura.

A idade da paciente maior que 60 anos corresponde a um fator prognóstico independente para a sobrevida. Pacientes acima de 60 anos morrem mais (Drekes *et al.*, 2018). Este trabalho mostrou que a maioria (68%) das pacientes apresentava ao diagnóstico idade superior a 60 anos. Pode ser cogitada a hipótese de que as pacientes mais jovens toleram mais as cirurgias mais agressivas e tratamentos quimioterápicos por mais tempo e intensidade que as pacientes idosas.

E além da idade, o estágio clínico da doença é um fator prognóstico independente para menor média de sobrevida. Geralmente o diagnóstico do câncer de ovário é realizado tardiamente, nos ECIII e ECIV. Neste estudo, aproximadamente 30% das pacientes inclusive já se apresentavam metastáticas ao diagnóstico (ECIV). Isso implica em inoperabilidade e prognóstico ruim.

A expressão do gene *TP53* é um importante indicador prognóstico das neoplasias malignas. Em câncer de ovário epitelial, encontra-se mutado em aproximadamente 40-80% dos casos. Em um estudo prévio, com 105 pacientes com câncer de ovário, foram

encontradas mutações em ~57% casos (Reles *et al.*, 2001). Alterações no p53 têm associação com doença pouco diferenciada, correlação significativa com resistência à platina, recaída precoce e diminuição da sobrevida global e sobrevida livre de doença (Reles *et al.*, 2001). Através da análise imunoistoquímica, este estudo mostrou aproximadamente 85% dos casos com p53 superexpresso, ou seja, mutado.

A literatura destaca ainda que há poucos estudos correlacionando o p53 quantitativo e a sobrevida em câncer de ovário (Geisler J *et al.*, 1997).

A frequência de MSI em câncer de ovário varia de 2-20% (Aysal *et al.*, 2012; Rambau *et al.*, 2016). A maioria dos casos de MSI são de carcinoma de células claras e carcinoma endometrióide (Jensen *et al.*, 2008).

Encontrou-se 14,8% de pacientes portadoras MSI no presente estudo. Ressalta-se que esta porcentagem corresponde aos casos de adenocarcinoma seroso de alto grau. O presente estudo não incluiu pacientes com carcinoma endometrióide e/ou mucinoso.

Yamashita *et al.*, em 2019, em revisão de 136 casos, encontrou 4,4% de MSI incluindo os subtipos carcinoma endometrióide, mucinoso e de células claras. Carcinoma seroso de alto grau foram apenas 2 casos de MSI dos 67 estudados.

Corroborando com Yamashita, não se encontrou correlação significativa do MSI com a idade, com o estágio clínico e com a expressão dos marcadores de imunoterapia CD8, PD-1 e PD-L1 na presente análise.

A expressão do PD-L1 na célula tumoral corresponde a maior estratégia de evasão imune em câncer. Quanto maior a expressão de PD-L1, menor a sobrevida global em comparação se menor expressão de PD-L1 (Hamanish *et al.*, 2015). Isto acontece devido a redução da infiltração do linfócito T no tumor e sugerindo que a expressão PD-L1 promove um microambiente imunossupressor inibindo a infiltração do linfócito.

Quanto à expressão do PD-L1 e a sobrevida há evidências de que em tumores, como o câncer de pulmão de células não pequenas, esta associação foi positiva. Há estudo também para câncer de ovário. Como existe ainda associação do impacto prognóstico negativo da expressão de PD-L1 em câncer de ovário (Hamanish *et al.*, 2015).

Vale lembrar que o uso de clones de anticorpos diferentes para identificar PD-1 e PD-L1 no tecido tumoral de cada laboratório pode alterar e impactar no resultado. Muitas vezes os kits utilizados na prática clínica são diferentes dos estudados em laboratório.

Hamanish *et al.*, em 2015 foram os primeiros pesquisadores a descrever a expressão de PD-L1 em câncer de ovário e encontraram expressão em 88% das células tumorais. Demonstraram relação inversa entre PD-L1 e linfócitos CD8+. Mulheres com alta expressão de PD-L1 têm pior sobrevida global e sobrevida livre de progressão (Mandai *et al.*, 2016)

As 28 pacientes deste trabalho apresentaram porcentagens baixas (mediana de 11%) da relação CD8/PD-L1 denotando esse microambiente imunossupressor descrito na literatura. Houve ainda, maior proporção da relação CD8/PD-1 nos casos com MSI estável.

A ligação PD-1/PD-L1 é conhecida como fenômeno de escape imune do tumor e não está validada como biomarcador no câncer de ovário. Não há biomarcadores preditivos de resposta, prognósticos e/ou que determinem o melhor paciente para receber imunoterapia em câncer de ovário ainda. Destaca-se que a expertise na análise dos marcadores de imunoterapia faz-se fundamental. Esta informação atualmente determina o uso ou não da imunoterapia em câncer de pulmão ou estômago, por exemplo. No entanto, em câncer de ovário esses marcadores não são validados para determinar terapia e o uso em um futuro próximo ainda é questionável.

A expressão de PD-L1 isolada não pode ser utilizada como potencial indicador de benefício dos inibidores de PD-1/PD-L1 sem a presença de TILS (Patel *et al.*, 2017)

Zhang *et al.*, 2003 analisaram 174 pacientes e evidenciaram que a presença de TILS foi associada em câncer de ovário com aumento de sobrevida global em detrimento da coorte sem TILS. Estes dados corroboram com outros estudos sumarizados em metanálise de 1815 pacientes (Hwang *et al.*, 2012). O impacto prognóstico positivo pode ser atribuído ao subgrupo com células T CD8+ intratumoral.

Certos estudos clínicos têm investigado a eficácia dos TILS em câncer de ovário e também da combinação da quimioterapia com TILS no tratamento. Os índices de resposta não excedem o da quimioterapia isolada e a duração de resposta foi menor (Kobayashi *et al.*, 1988).

Terapia com células T adaptativas foi utilizada em câncer de ovário avançado, em pacientes com câncer sem evidência de doença após a cirurgia e quimioterapia com cisplatina, em um estudo fase I não randomizado. Neste estudo, os pacientes recebiam TILS autólogo com quimioterapia ou quimioterapia isolada. A sobrevida global em 3 anos foi de 100% no grupo experimental e 67,5% no controle (Fujita *et al.*, 1995). Todavia, embora o câncer de ovário seja imunogênico, os TILS são menos pronunciados que em outras malignidades e isso dificultaria o uso da imunoterapia nesse cenário.

Uma das limitações deste estudo corresponde a amostra pequena (muitos blocos inclusive foram perdidos devido à qualidade do material). Mesmo assim, a demonstração estatística relacionada entre a associação de recidiva e o status MSI deve ser relevado com o n deste estudo (n=4). Corresponde a um dado estatístico em conformidade com a literatura, mas que os estudos publicados contém um número amostral maior, podendo ter impactado em viés aqui. Contudo, no atual trabalho, releva-se que as amostras eram de carcinoma seroso exclusivas sem outras histologias como nos estudos revisados na literatura. Entretanto, não é possível excluir que um número amostral possa revelar um resultado diferente.

Ainda, inferir, baseado apenas nos resultados aqui apresentados, que a presença de MSI impactaria na sobrevida livre de recidiva, possa parecer muito pretencioso, os tumores malignos com MSI instável respondem melhor à imunoterapia, conforme dados robustos da literatura (Rustin *et al.*, 2012).

A seleção de pacientes torna-se fundamental para uso da imunoterapia de modo efetivo no câncer epitelial de alto grau visto a heterogeneidade tumoral e que inclusive, essa seleção pode promover otimização de custos no tratamento do câncer ao prover terapia específica ao paciente selecionado.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram a viabilidade de análise dos marcadores PD-1, PD-L1, CD8, MSI (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) e p53 em amostras de carcinoma epitelial seroso avançado de ovário.

As características clínicas das pacientes e histopatológicas das amostras estudadas corroboram os dados da literatura.

Neste estudo, as amostras com estabilidade de MSI apresentam maior proporção de CD8/PD-1 e as pacientes nesta condição recidivam menos. Por outro lado, houve associação de recidiva com a instabilidade de MSI ($p=0,03$).

9 REFERÊNCIAS

- Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, Lynch AG, Riad M, Sharma R, Stewart C, Fereday S, Caldas C, Defazio A, Bowtell D, Brenton JD. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol*. 2010 May; 221(1): 49-56.
- Amendola LCB, Vieira R. Brca Genes Contribution in the hereditary predisposition for breast cancer. *Rev Bras Cancerol* 2005; 51(4): 325-30.
- André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D et al., for the KEYNOTE-177 Investigators. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 2207-2218.
- Angela Reles, Wen H. Wen, Annette Schmider, Conway Gee, Ingo B. Runnebaum, Uta Kilian, Lovell A. Jones, Adel El-Naggar, Carmen Minguillon, Ines Schönborn, Olaf Reich, Rolf Kreienberg, Werner Lichtenegger, and Michael F. Press² Department of Pathology.
- Angela Reles, Wen H. Wen, Annette Schmider, Conway Gee, Ingo B. Runnebaum, Uta Kilian, Lovell A. Jones, Adel El-Naggar, Carmen Minguillon, Ines Schönborn, Olaf Reich, Rolf Kreienberg, Werner Lichtenegger and Michael F. Press. Correlation of *p53* Mutations with Resistance to Platinum-based Chemotherapy and Shortened Survival in Ovarian Cancer
- Aoki Y, Takakuwa K, Kodama S, et al. Use of adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes alone or in combination with cisplatincontaining chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:1934–9. 26.
- Aysal A, Karnezis A, Medhi I, Grenert J.P, Zaloudek C.J, Rabban J.T. Ovarian endometrioid adenocarcinoma: Incidence and clinical significance of the morphologic

- and immunohistochemical markers of mismatch repair protein defects and tumor microsatellite instability. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36, 163–172.
- Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, Levionnois E, Nizard M, Si-Mohamed A, Besnier N et al. PD-1 expressing tumor infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013; 73 (1):128-38.
- Barbara A. Goff. Frequency of Symptoms of Ovarian Cancer in Women Presenting to Primary Care Clinics. *JAMA.* 2004; 291: 2705-12.
- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Immunol Immunother.* 2007 May; 56(5): 739-45.
- Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016; 39(1): 98-106.
- Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS et al. for the Gynecologic Oncology Group. Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2011; 365: 2473-83.
- Cengiz A, Koç ZP, Kara PO and Yürekli Y. *Mol Imaging Radionucl Ther* 2019 Mar; 28(1): 8-14.
- Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018 Feb; 26(2) e 15-e21.
- Changxin Wan, Matthew P Keany, Han Dong, Linah F Al-Alem, Unnati M Pandya, Suzan Lazo, Karsten Boehnke, Katherine N. Lynch, Rui Xu, Dominique T. Zarrella, Shengqing Gu, Paloma Cejas, Klothilda Lim, Henry W. Long, Kevin M. Elias, Neil S. Horowitz, Colleen M Feltmate, Michael G Muto, Michael J Worley Jr, Ross S

- Berkowitz, Ursula A Matulonis, Marisa R Nucci, Christopher P Crum, Bo R Rueda, Myles Brown, Xiaole Shirley Liu, Sarah J Hill. Enhanced efficacy of simultaneous PD-1 and PD-L1, immune checkpoint blockade in high. Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on November 7, 2020. © 2020 American Association for Cancer Research.
- Chiesa-Vottero AG, Malpica A, Deavers MT, Broaddus R, Nuovo GJ, Silva, EG. Immunohistochemical Overexpression of p16 and p53 in Uterine Serous Carcinoma and Ovarian High-grade Serous Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2007 Jul; 26(3): 328-33.
- Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77: 1303-10.
- Cohen RCR, Cocherneau D, Duval A, Lascols O, Trabada DL, Afchai P, Trouilloud I, Parc Y et al. Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. *Bulletin du Cancer* 2017 Jan; 104(1): 42-51.
- Colombo N, Sessa C, Du Bois A, Ledermann A et al. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Ann Oncol* 2019 May 1; 30(5): 672-705.
- Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017; 2018: 17-38.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (Dec 2006). "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors". *Pharmacological Reviews*. 58 (4): 773-81.

- Drakes ML, Mehrotra S, Aldulescu M, Potkul RK, Liu Y, Grisoli A et al. Stratification of ovarian tumor pathology by expression of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand- 1 (PD-L1) in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2018 May 30;11(1): 43.
- Du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I and Pfisterer J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer* 2009; 115(6): 1234–1244. *Annals of Oncology* 2019 May; 30(5): 672-705.
- Du Bois, A. A Randomized Clinical Trial of Cisplatin/Paclitaxel Versus Carboplatin/Paclitaxel as First-Line Treatment of Ovarian Cancer. *Cancer Spectrum Knowledge Environment* 2003; 95(17): 1320-1329.
- Dung T. Le, MD., Jennifer N. Uram, Ph. D., Hao Wang, Ph. D, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372:2509-2520.
- Ebell MH, Culp MBB, Radke TJ. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *American Journal of Preventive Medicine* 2016 Mar; 50(3): 384-94.
- Fader AN, Diaz LA, Armstrong DK, Tanner EJ, Uram, J, Eyring A et al. Preliminary results of a phase II study: PD-1 blockade in mismatch repair–deficient, recurrent or persistent endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 2016; 141: 206–7.
- Fagotti A, Perelli F, Pedone L, Scambia G. Current Recommendations for Minimally Invasive Surgical Staging in Ovarian Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2016 Jan; 17(1):3.
- Fleming ND, Nick AM, Coleman RL, Westin SN, Ramirez PT, Soliman PT, et al. Laparoscopic surgical algorithm to triage the timing of tumor reductive surgery in advanced ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2018; 132.

Friedlander M, Okamoto A, Moore KN, Ben-Baruch NE, Werner TL, Cloven NG, Oaknin A, DiSilvestro PA et al. Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381:2403-15.

Fujita K, Ikarashi H, Takakuwa K, et al. Prolonged disease-free period in patients with advanced epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res* 1995;1:501–7.

Gadducci A, Cosio S, Zola P, Landoni F, Maggino T, Sartori E. Surveillance procedures for patients treated for epithelial ovarian cancer: a review of the literature. *Int J Gynecol Cancer* 2007;171: 21-31.

Gadkar-Sable S, Shah C, Rosario G, Sachdeva G, Puri C. Progesterone receptors: various forms and functions in reproductive tissues. *Frontiers in Bioscience* 2005; 10 (1–3): 2118–30.

Gaillard SL, Secord AA, Monk B. The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol. Res Pract* 2016; 3: 1-14.

Gao B, Lindemann K, Anderson L, Fereday S, Hung J, Alsop K et al. Serous ovarian and primary peritoneal cancers: A comparative analysis of clinico-pathological features, molecular subtypes and treatment outcome. *Gynecologic Oncology* 2016; 142(3):458-64.

Gatalica Z, Vranic S, Xiu J, Swensen J, Reddy S. High microsatellite instability (MSI- H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine. *Familial Cancer*. 2016;15(3): 405-12.

Geisler J et al. Quantification of p53 in Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncologic*. 1997; 66: 435-438.

Globocan 2020 - The Global Cancer Observatory /<https://gco.iarc.fr/>

- González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, Christensen RD, Graybill W, Mirza MR, McCormick C, Lorusso D, Hoskins P, Freyer G, Baumann, K, Jardon, K et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381: 2391-2402.
- Goode EL, Block MS, Kalli KR, Vierkant RA, Chen W et al. Dose response association of CD8+ tumor infiltrating lymphocytes and survival time in high grade serous ovarian cancer. *Ovarian Tumor Tissue Analysis (OTTA)*. *JAMA Oncol* 2017;3 e173290-e173290.
- Gouy S, Belghiti J, Uzan C, Canlorbe G, Gauthier T, Morice P. Accuracy and reproducibility of the peritoneal cancer index in advanced ovarian cancer during laparoscopy and laparotomy. *Int J Gynecol Cancer* 2013 Nov; 23(9): 1699-703.
- Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, Kanai M et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients with Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Dec 1; 33(34): 4015-22
- Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(9):3360–5.
- Yamashita H, Nakayama K, Ishikawa M et al .Relationship between Microsatellite Instability, Immune Cells Infiltration, and Expression of Immune Checkpoint Molecules in Ovarian Carcinoma: Immunotherapeutic Strategies for the Future *Int. J. Mol. Sci*. 2019, 20, 5129; doi:10.3390/ijms20205129
- Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012;124(2):192–8.

INCA- Instituto Nacional do Câncer 2020 online.

Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017 Apr; 4(24)(1): 26.

Jacobs I, Bast RC Jr. The Ca 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989; 4: 1-12.

Jensen KC, Mariappan MR, Putcha GV, Husain A, Chun N, Ford JM, Schrijver I, Longacre TA. Microsatellite Instability and Mismatch Repair Protein Defects in Ovarian Epithelial Neoplasms in Patients 50 Years of Age and Younger. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008, 32, 1029–1037

Kabiraj A, Gupta J, Khaitan T, Bhattacharya PT. Principle and Techniques of Immunohistochemistry - a Review. *International Journal of Biological & Medical Research. Int J Biol Med Res.* 2015;6(3):5201-5210.

Katsumata N, Yasuda M, Isonishi S, Takahashi F, Michimae H, Kimura E et al. Long-term results of dose-dense paclitaxel and carboplatin versus conventional paclitaxel and carboplatin for treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer (JGOG 3016): a randomised, controlled, open-label trial. *The Lancet Oncology* 2013; 14(10):1 020-26.

Kim CK, Park BK, Choi JY, Kim BG, Han H. Detection of recurrent ovarian cancer at MRI: comparison with integrated PET/CT. *J Comput Assist Tomogr* 2007; 316: 868-875.

Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, Callahan MJ, Garner EO, Gordon RW, Birch C, Berkowitz RS, Muto MG, Crum CP. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol* 2007 Feb; 31(2): 161-9.

- Kobayashi H, Maeda M, Hayata T, et al. [Clinical study of combination chemotherapy with CDDP, ADM and CPM for ovarian cancer]. *Nihon Gan Chiryo Gakkai Shi* 1988; 23:829–36.
- Králíčková M, Laganà AS, Ghezzi F and Vetvicka V. Endometriosis and risk of ovarian cancer: what do we know? *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2019 on line.
- Kurman RJ, Carcangiu, ML, Herrington, CS, Young, RH. WHO Classification of Tumours Female Reproductive Organs. 4th Edition, 2014.
- La Vecchia, C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev* 2017 Jan; 26(1): 55-62.
- Lalit Kumar, MD, DM, Suchitra Barge, MBBS, Ashok K. Mahapatra, MS, MCh, Sanjay Thulkar, MD, Gaura Kishore Rath, MD, Sunesh Kumar, MD, Renu Mishra, MD, Ramesh Dawar, MD, and Rajveer Singh, PhD From the Institute Rotary Cancer Hospital, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India. Central Nervous System Metastases from Primary Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Control* May/June 2003, Vol.10, No.3
- Lampe B, Kroll N, Piso P, Forner DM, Mallmann P. Prognostic significance of Sugarbaker's peritoneal cancer index for the operability of ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2015 Jan; 25(1): 135-44.
- Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial Ovarian Cancer: Evolution of Management in the Era of Precision Medicine. *CA Cancer J Clin* 2019 Jul; 69(4): 280-304.
- Lindsey A. Torre, MSPH et al. Ovarian Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 284-296.
- Lowry KP, Lee SI. Imaging and Screening of Ovarian Cancer. *Radiologic Clinics of North America* 2017; 55(6): 1251-59.

- Madariaga A, Lheureux S, Oza AM. Tailoring Ovarian Cancer Treatment: Implications of BRCA1/2 Mutation. *Cancer* 2019; 11: 416.
- Makoto Kurachi, Josephine R Giles, Zeyu Chen, Valentina Casella, Shin Foong Ngiew, Omar Khan, Yinghui Jane Huang, Patrick Yan, Kito Nzingha, Wei Xu, Ravi K Amaravadi, Xiaowei Xu, Giorgos C Karakousis, Tara C Mitchell, Alexander C Huang, E John Wherry et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8⁺ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms, *Immunity* 2020 May 19;52(5):825-841. e8.
- Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Giacomo AMD, Acosta ADJ, Delord JP, Geva R, Gottfried M, Nicolas Penel et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* 2020 Jan 1; 38(1): 1-10.
- Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD et al. A Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1991 Jun 1; 51(11): 2979-84.
- Masaki Mandai, Junzo Hamanishi, Kaoru Abiko, Noriomi Matsumura, Tsukasa Baba, Ikuo Konishi R. Anti-PD-L1/PD-1 immune therapies in ovarian cancer: basic mechanism and future clinical application. *Int J Clin Oncol* 11/03/2016
- McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke Pearson DL, Davidson M. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996; 334: 1-6.
- Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, Garber JE, Cramer DW, Crum CP. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol* 2006 Feb; 30(2): 230-6.

Moss EL, Hollingworth J, Reynolds, TM. The role of CA125 in clinical practice. *J Clin Pathol* 2005; 58:308–312.

Mouw KW, Goldberg MS, Konstantinopoulos PA, D’Andrea AD. DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response. *Cancer Discov* 2017; 7: 675-93.

Nakano O, Sato O, Naito Y et al. Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma. Clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Can Res* 2001; 61:5132-6.

NCCN – National Comprehensive Cancer Network 2021 online.

Oken MM et al 1982), Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982 Dec;5(6):649-655. PMID: 7165009.

O’Malley DM, Oaknin A, Matulonis UA, et al: Mirvetuximab soravtansine, a folate receptor alpha (FR α) - targeting antibody-drug conjugate, in combination with bevacizumab in patients with platinum-agnostic ovarian cancer: Final analysis. 2021 ASCO Annual Meeting. Abstract 5504. Presented June 7, 2021.

O'Neill CJ, Deavers MT, Malpica A, Foster H, McCluggage WG. An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2005 Aug; 29(8): 1034-41.

Openshaw MR, Fotopoulou C, Blagden S, Gabra H. The next steps in improving the outcomes of advanced ovarian cancer. *Women’s Health* 2015;11: 355-67.

Pannu HK, Bristow RE, Cohade C, Fishman EK, Wahl RL. PET-CT in recurrent ovarian cancer: initial observations. *Radiographics* 2004; 241: 209-223.

- Partridge EE, Barnes MN. Epithelial Ovarian Cancer: Prevention, Diagnosis, and Treatment. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 297-320.
- Patel SJ, Sanjana NE, Kishton RJ, et al. Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature* 2017; 548:537–42.
- Pawlowska A, Suszczyk D, Okla K, Kotarski BJ, Wertel I. Immunotherapies based on PD-1/PD-L1 pathway inhibitors in ovarian cancer treatment. *The Journal of Translational Immunology* 2018; 195: 334-344.
- Pedro AO, Neto AMP, Paiva LHSC, Maria José Osis MJ, Hardy E. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. Age at natural menopause among Brazilian women: results from a population-based survey. *Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro* 2003 Jan/Feb; 19(1).
- Pietzner K, Nasser S, Alavi S, Darb-Esfahani S, Passler M, Muallem MZ, Sehouli J. Checkpoint-inhibition in ovarian cancer: rising star or just a dream? *Gynecol Oncol* 2018 Nov; 29(6):e93.
- Pignata S, Cecere SC, Du Bois A, Harter P, Heitz F. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ann Oncol* 2017;28(Suppl 8): vii51-vii56.
- Pignata S, Scambia G, Ferrandina G, Savarese A, Sorio R, Breda et al. Carboplatin Plus Paclitaxel Versus Carboplatin Plus Pegylated Liposomal Doxorubicin As First-Line Treatment for Patients With Ovarian Cancer: The MITO-2 Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol* 2011; 29(27): 3628-35.
- Pomel C, Jeyarajah A, Oram D, Shepherd J, Milliken D, Dauplat J, Reynold K. Cytoreductive surgery in ovarian cancer. *Cancer Imaging* 2007 Dec 17;7(1):210-5.
- Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23(3):609-18.

- Powles T, Park SH, Voog E, Caserta C, Valderrama BP, Gurney H, Kalofonos H et al. Avelumab Maintenance Therapy for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 2020; 383: 1218-30.
- Prakash P, Cronin CG, Blake MA. Role of PET/CT in Ovarian Cancer. *AJR Roentgenol.* 2010 Jun; 194(6): W464-70.
- Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, GebSKI V, Penson RT, Oza AM, Pignata S. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2017; 18(9):1274-84.
- Ravikumar Muthuswamy, Aj Robert McGray, Sebastiano Battaglia, Wenjun He, Anthony Miliotto, Cheryl Eppolito, Junko Matsuzaki, Tsuji Takemasa, Richard Koya, Thistle Chodon, Brian D Lichty, Protul Shrikant, Kunle Odunsi. CXCR6 by increasing retention of memory CD8+ T cells in the ovarian tumor microenvironment promotes immunosurveillance and control of ovarian cancer. *J Immunother Cancer.* 2021 Oct; 9(10):e003329.
- Rambau PF, Duggan MA, Ghatage P, Warfa K, Steed H, Perrier R, Kelemen LE, Köbel M. Significant frequency of MSH2/MSH6 abnormality in ovarian endometrioid carcinoma supports histotype-specific Lynch syndrome screening in ovarian carcinomas. *Histopathology* 2016, 69, 288–297.
- Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csősz T, Fülöp A, Gottfried M et al. for the KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375:1823-1833.
- Richman S. Deficient mismatch repair: read all about it (review). *Int J Oncol.* 2015;47(4):1189-202.

- Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*. 2009 Sep 15; 80(6):609-16.
- Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Macpherson E et al. Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:1382-92.
- Schmid P, Adams A, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379:2108-21.
- Sehgal R, Sheahan K, O'Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC. Lynch syndrome: an updated review. *Genes (Basel)* 2014; 5(3):497-507.
- Shelley WE, Carmichael JC, Brown LB, et al. Adriamycin and cisplatin in the treatment of stage III and IV epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1988;29:208–21. 27.
- Shin DW, Choi YJ, Kim HS, Han KD, Yoon H, Park YS , Kim N, Lee DH. Secondary Breast, Ovarian, and Uterine Cancers After Colorectal Cancer: A Nationwide Population-Based Cohort Study in Korea. *Dis Colon Rectum* 2018 Nov; 61(11):1250-1257.
- Skilling JS, Sood A, Niemann T, Lager DJ, Buller RE An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. *Oncogene* 1996 Jul 4; 13(1):117-23.
- Sohaib SAA and Reznick RH. MR imaging in ovarian cancer. *Cancer Imaging* 2007 Oct 1;7 Spec No A (Special issue A): S119-29.
- Study of Chemotherapy with Pembrolizumab (MK-3475) Followed by Maintenance With Olaparib (MK-7339) for the First-Line Treatment of Women With BRCA Non-mutated Advanced Epithelial Ovarian Cancer (EOC) (MK-7339-001/KEYLYNK-001/ENGOT-ov43/GOG-3036) [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03740165](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03740165)

- Suh DH, Kim M, Lee KH et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2017. *J Gynecol Oncol* 2018; 29:1-18.
- Szabova L, Yin C, Bupp S, Guerin TM, Schlomer JJ, Householder DB, Baran ML et al. Perturbation of Rb, p53 and Brca1 or Brca2 Cooperate in Inducing Metastatic Serous Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2012; 72(16): 4141-53.
- Verhaak, RGW et al. Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 2013; 123:517-525.
- Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, Stéphane Dalle, Schenker M, et al., for the CheckMate 238 Collaborators* Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377:1824-1835.
- Weimin Wang, PhDa, Janice Rebecca Liu, MDb, Weiping Zou. Immunotherapy in Ovarian Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 28 (2019) 447–464
- Wen, H. W., Reles, A., Runnebaum, I. B., Sullivan-Halley, J., Bernstein, L., Jones, L. A., Felix, J. C., Kreienberg, R., el-Naggar, A., and Press, M. F. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 18: 29–41, 1999.
- Yang WL, Lu Z, Bast Jr RC. The Role of Biomarkers in the Management of Epithelial Ovarian Cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2017 Jun; 17(6): 577-591.
- Y-L Chen, W-F Cheng, C-Y Hsieh, C-A Chen. Brain metastasis as a late manifestation of ovarian carcinoma. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2011 Jan; 20(1):44-9.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(3):203–13. 2.
- Zhu X, Lang J. Programmed death-1 pathway blockade produces a synergistic antitumor effect: combined application in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2017; 28:1-19.

10 ANEXOS

Aprovações nos Comitês de Ética em Pesquisa