

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher

Sidnéa Macioci Cunha

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM PACIENTES COM
CARCINOMA SEROSO DE ALTO GRAU DE OVÁRIO E SUA CORRELAÇÃO
COM RESPOSTA AO TRATAMENTO E SOBREVIVÊNCIA**

Belo Horizonte

2022

Sidnéa Macioci Cunha

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM PACIENTES COM
CARCINOMA SEROSO DE ALTO GRAU DE OVÁRIO E SUA CORRELAÇÃO
COM RESPOSTA AO TRATAMENTO E SOBREVIVÊNCIA**

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais para título de mestre em Saúde da Mulher

Orientador: Eduardo Batista Cândido

Co-orientadora: Letícia da Conceição Braga

Área de Concentração: Saúde da Mulher

Belo Horizonte

2022

Ficha catalográfica

C972 Cunha, Sidnéa Macioci.
Caracterização do perfil imunológico em pacientes com Carcinoma Seroso de Alto Grau de Ovário e sua correlação com resposta ao tratamento e sobrevida [recursos eletrônicos]. / Sidnéa Macioci Cunha. - - Belo Horizonte: 2022.
62f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Batista Cândido.
Coorientador (a): Letícia da Conceição Braga.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma Epitelial do Ovário. 2. Microambiente Tumoral. 3. Linfócitos Intraepiteliais. 4. Biomarcadores Tumoriais. 5. Dissertação Acadêmica. I. Cândido, Eduardo Batista. II. Braga, Letícia da Conceição. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 322

Ata de aprovação da defesa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CENTRO DE PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA/SIDNÉA

MACIOCI CUNHA

Realizou-se, no dia 16 de agosto de 2022, às 11:00 horas, on-line, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Caracterização do perfil imunológico em pacientes com carcinoma seroso de alto grau de ovário e sua correlação com resposta ao tratamento e sobrevida*, apresentada por SIDNÉA MACIOCI CUNHA, número de registro 2019657923, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, e seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Eduardo Batista Candido - Orientador (UFMG), Profª Letícia da Conceição Braga - Coorientadora, Prof(a). Agnaldo Lopes da Silva Filho (UFMG), Prof(a). Walter Antônio Prata Pace (FCMMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada eletronicamente pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 16 de agosto de 2022.

Prof(a). Eduardo Batista Candido - orientador (Doutor)

Profª Letícia da Conceição Braga - Coorientadora (Doutora)

Prof(a). Agnaldo Lopes da Silva Filho (Doutor)

Prof(a). Walter Antônio Prata Pace (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Agnaldo Lopes da Silva Filho, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Batista Candido, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia da Conceição Braga, Usuária Externa**, em 30/05/2023, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **WALTER ANTONIO PRATA PACE, Usuário Externo**, em 07/06/2023, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1672053** e o código CRC **911EA392**.

RESUMO

Introdução: O câncer epitelial de ovário (CEO) é uma doença insidiosa e de grande letalidade, que ainda representa um desafio para a ginecologia. Apesar dos inúmeros avanços científicos, nenhuma nova abordagem diagnóstica ou terapêutica foi capaz de melhorar prognóstico ou mortalidade pela doença. O microambiente tumoral (TME) exerce grande influência sobre o crescimento e propagação tumoral. Células do sistema imunológico presentes no TME podem interagir com o tumor em desenvolvimento determinando sua progressão ou regressão. Este estudo pretende avaliar a associação dos marcadores imuno-histoquímicos, linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ e macrófagos CD68⁺ (M0) e L1/MAC387⁺ (M1) e dos inibidores de imuno checkpoints, PD-L1 e PD-L2 presentes no TME com desfechos clínicos e prognóstico no carcinoma ovariano epitelial de alto grau.

Métodos: Avaliaram-se retrospectivamente 24 mulheres com carcinoma ovariano seroso de alto grau submetidas a tratamento convencional padrão (citorredução e quimioterapia baseado em platina). A análise e quantificação dos biomarcadores imunológicos no microambiente tumoral, CD8, CD4, CD68, L1/MAC387, PD-L1 e PD-L2, foi realizada através de imuno-histoquímica em lâminas histológicas contendo tecido tumoral ovariano para cada uma das pacientes do estudo. Posteriormente, fez-se a associação entre a expressão desses biomarcadores e a ocorrência de óbito, citorredução e resposta à platina. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste Mann-Whitney ou Qui quadrado. As diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados: Observou-se uma média de idade de 58 anos para as pacientes estudadas. 79,16% dos casos foram diagnosticados em estadio avançado, sendo a grande maioria com elevação significativa de Ca 125 (83,32% acima de 300 U/mL) e ascite (62,5%) já no momento do diagnóstico. O número de recorrências da doença após tratamento também foi expressivo (57,14%). Das pacientes que evoluíram para óbito, quase 60% ocorreram antes de 3 anos do diagnóstico. A expressão do bloqueador de imuno checkpoint PD-L2 foi associada ao padrão de resposta à platina de forma estatisticamente significativa, sugerindo uma relação desta proteína com pior prognóstico da doença. Para os marcadores imunológicos, CD4, CD8, CD68 e L1/MAC387, percebe-se maior expressão em pacientes platino-sensíveis e menor expressão do grupo óbito e de citorredução ótima.

Conclusões: Mulheres com carcinoma seroso de alto grau frequentemente têm doença avançada já ao diagnóstico e mesmo com altas taxas de resposta à platina, as recorrências são muito frequentes. A presença de células inflamatórias no

microambiente tumoral parece interferir com o prognóstico, mas ainda faltam dados consistentes para afirmar o real papel desses biomarcadores para diagnóstico precoce ou terapias direcionadas. A expressão de PD-L2 foi associada a pior prognóstico nas pacientes com carcinoma ovariano seroso de alto grau, abrindo uma perspectiva de ampliar a investigação sobre o efeito prognóstico dessa proteína isolada ou em associação com outros marcadores para as pacientes com câncer de ovário.

Palavras-chave: Câncer epitelial de ovário; microambiente tumoral, imuno checkpoints, linfócitos intraepiteliais tumorais

ABSTRACT

Introduction: Epithelial ovarian cancer (EOC) is an insidious and highly lethal disease that still represents a gynaecological challenge. Despite numerous scientific advances, no new diagnostic or therapeutic approach has been able to improve prognosis or mortality from the disease. The tumor microenvironment (TME) exerts great influence on tumor growth and spread. Cells of the immune system present in the TME may interact with the developing tumor determining its progression or regression. This study aims to evaluate the association of immunohistochemical markers, TCD8⁺ and TCD4⁺ lymphocytes and CD68⁺ (M0) and L1/MAC387⁺ (M1) macrophages and of the immune checkpoint inhibitors, PD-L1 and PD-L2 present in TME with clinical outcomes and prognosis in high grade epithelial ovarian carcinoma. **Methods:** We retrospectively evaluated 24 women with high-grade serous ovarian carcinoma undergoing standard conventional treatment (cytoreduction and platinum-based chemotherapy). Analysis and quantification of immunological biomarkers in the tumor microenvironment, CD8, CD4, CD68, L1/MAC387, PD-L1 and PD-L2, was performed by immunohistochemistry on histological slides containing ovarian tumor tissue for each of the patients in the study. Subsequently, an association was made between the expression of these biomarkers and the occurrence of death, cytoreduction and response to platinum. The differences between groups were evaluated by the Mann-Whitney or Chi-square test. Differences with a p value < 0.05 were considered significant. **Results:** A mean age of 58 years was observed for the patients studied. 79.16% of the cases were diagnosed in advanced stage, the vast majority with significant elevation of Ca 125 (83.32% above 300 U/mL) and ascites (62.5%) already at the time of diagnosis. The number of recurrences of the disease after treatment was also significant (57.14%). Of the patients who died, almost 60% died within 3 years of diagnosis. The expression of the immune checkpoint blocker PD-L2 was statistically significantly associated with the response pattern to platinum, suggesting a relationship of this protein with worse disease prognosis. For immunological markers, CD4, CD8, CD68 and L1/MAC387, we noticed higher expression in platinum-sensitive patients and lower expression in the death and optimal cytoreduction groups. **Conclusions:** Women with high grade serous carcinoma often have advanced disease already at diagnosis and even with high response rates to platinum, recurrences are very frequent. The presence of

inflammatory cells in the tumor microenvironment seems to interfere with prognosis, but consistent data to affirm the real role of these biomarkers for early diagnosis or targeted therapies are still lacking. PD-L2 expression was associated with worse prognosis in patients with high-grade serous ovarian carcinoma, opening a perspective to expand the investigation on the prognostic effect of this protein alone or in association with other markers for ovarian cancer patients.

Keywords: Epithelial ovarian cancer; tumor microenvironment, immune checkpoints, tumor intraepithelial lymphocytes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Classificação dos tumores ovarianos	12
1.2 O Microambiente Tumoral	14
1.3 Tratamento do câncer de ovário	15
1.4 Imunologia e o Câncer Ginecológico	16
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVO	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. SUJEITOS E MÉTODOS	25
4.1 DESENHO DO ESTUDO E TAMANHO AMOSTRAL	25
4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS, LINFÓCITOS T CD8+, T CD4+, E MACRÓFRAGOS CD68+, L1/MAC 387+, E DOS <i>IMMUNE CHECKPOINTS</i> PD-L1 E PD-L2	28
4.3 ANÁLISE DOS DADOS	29
4.4 ASPECTOS ÉTICOS	32
4.5 FINANCIAMENTO E CRÉDITOS SUPORTE E APOIO TÉCNICO	32
5. RESULTADOS	32
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA	32
5.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS LINFÓCITOS T CD8+, T CD4+, e macrófagos CD68+, L1/MAC 387+	34
5.3 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES <i>IMMUNE CHECKPOINTS</i> PD-L1 E PD-L2	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÕES	47
8. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

O câncer de ovário é a neoplasia maligna mais letal entre as mulheres. Grandes esforços têm sido feitos em busca de uma forma de diagnóstico precoce, bem como de novas modalidades terapêuticas no intuito de reduzir a mortalidade pela doença. Apesar de todos os avanços científicos e tecnológicos, a mortalidade por câncer de ovário continua estagnada desde 1980. É uma doença com alto índice de recidivas e baixa sobrevida em 5 anos¹. Além disso, mais de 75% dos casos são diagnosticados em fase tardia devido à ausência de sintomas precoces específicos ou testes de rastreamento eficazes².

É uma doença composta por uma grande variedade de grupos de tumores com particularidades morfológicas, genéticas e moleculares distintas³. A necessidade de uma classificação de base molecular está crescendo no cenário mundial de diagnóstico e terapêutico do câncer de ovário, a fim de melhor estratificar e desenvolver terapias específicas. Atualmente, percebe-se a busca pelo desenvolvimento de biomarcadores imuno-histoquímicos como uma estratégia mais acessível em substituição à análise molecular⁴.

Além de ser a malignidade ginecológica de maior letalidade, o câncer de ovário é a quinta causa mais frequente de mortalidade relacionada ao câncer em mulheres nos Estados Unidos da América (EUA)⁵. A incidência estimada no Brasil segundo o INCA para o triênio 2020-2022 é de 6.650 novos casos, correspondendo a 6,18 casos novos para cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de ovário ocupa a oitava posição mais frequente, sendo a estimativa de 7,01 casos para cada 100 mil mulheres. Também é o oitavo câncer mais comum em mulheres no mundo⁶. O tipo mais incidente é o epitelial (EOC) e a mortalidade no Brasil chega a 3,62%⁷.

A distribuição da incidência do câncer de ovário no mundo também não é uniforme, tendendo a ser maior em países mais desenvolvidos. Acomete geralmente mulheres a partir da quinta e sexta décadas de vida, especialmente quando se fala no subtipo seroso de alto grau. Existem fatores de risco bem conhecidos para a doença, como as mutações relacionadas aos genes BCRA 1 e BRCA 2, síndrome de Lynch, entre outras. A endometriose também foi relacionada a um maior risco para o câncer de ovário, especialmente os de células claras e endometrióides. Outro possível evento associado à etiopatogenia do câncer de ovário é a ovulação incessante, de forma que qualquer situação que reduza a quantidade de ciclos ovulatórios da mulher (gravidez, amamentação, uso de pílula hormonal) poderia funcionar

como fator protetor. Tabagismo, obesidade, uso de talco perineal e diabetes são outros fatores de risco para a doença¹.

Contrariando a teoria de origem do tumor ovariano no mesotélio (epitélio de superfície ovariana), muitos estudos têm sugerido que os tumores ovarianos podem ter sua origem em outros órgãos pélvicos, como os tumores serosos provenientes do epitélio tubário. Essa evidência está na detecção de carcinoma intra-epitelial tubário seroso (STIC) nas trompas de Falópio de pacientes assintomáticas^{8,9}. Os tumores endometrióides e de células claras estariam associados a endometriose, e os mucinosos e de Brenner provenientes de um epitélio transicional decorrente de metaplasia tubária. Baseado nesses conceitos, novas formas de prevenção, screening e tratamento estão sendo buscadas na tentativa de reduzir os impactos em termos de mortalidade para uma doença tão desafiadora³.

Em relação às vias de disseminação do câncer de ovário, a via mais comum de metástase de células cancerosas é a via transcelômica, que depende do desprendimento das células cancerosas do tumor primário e seu movimento através do fluido peritoneal para outras estruturas pélvicas e abdominais e para órgãos adjacentes. Uma via adicional seria por meio de vasos linfáticos para os linfonodos pélvicos e paraaórticos. Já os padrões clássicos de metástases por via hematogênica também podem ocorrer no câncer de ovário, mas não é a forma dominante, sendo responsável por metástases à distância¹⁰.

1.1 Classificação dos tumores ovarianos

Os tumores de ovário podem ser classificados, conforme a OMS, de acordo com o tipo histológico, sendo os carcinomas epiteliais os responsáveis por pelo menos 90% dos casos. Destes, o subtipo seroso de alto grau (HGSOC) é o mais desafiador, responsável pela grande estatística de mortalidade, sendo, portanto, o objeto deste estudo¹.

Esforços recentes para estudar o EOC da perspectiva molecular e genética levaram a uma mudança de paradigma na classificação desta doença através da introdução do modelo dualístico de carcinogênese ovariana. Esse modelo foi proposto pela primeira vez por Kurman e Shih em 2004 e desde então conquistou ampla aceitação, sendo oficialmente reconhecido em 2014 pela OMS em suas diretrizes de classificação atualizadas para tumores dos órgãos reprodutivos femininos¹.

Com base nesse modelo, os grupos de tumores de ovário seriam classificados em “tipo I” e “tipo II”. Os “tipo I” são compostos por tumores serosos e endometrióides de baixo grau, tumores de células claras, tumores mucinosos e tumores de células transicionais ou de

Brenner. São tumores com comportamento indolente, geralmente limitados aos ovários e estáveis geneticamente. Já os “tipo II” apresentam um comportamento mais agressivo, muitas vezes já se apresentando em estágios avançados ao diagnóstico. Neste grupo temos os carcinomas serosos de alto grau, carcinomas indiferenciados e os tumores müllerianos mistos (carcinossarcomas). Diferente dos tumores do “tipo I”, os do “tipo II” apresentam mutações genéticas com frequência³.

Do ponto de vista citológico, o HGSOE é caracterizado por atipia nuclear de alto grau; com núcleos grandes, hipercromáticos e pleomórficos com potencial para multinucleação. Os nucléolos são geralmente proeminentes e podem parecer grandes e eosinofílicos. Geralmente há um índice mitótico alto com uma abundância de figuras mitóticas visíveis que podem ser de aparência atípica. Corpos de psammoma, que são áreas de calcificação tipicamente associadas a tumores papilares, também estão tipicamente presentes¹.

Molecularmente podemos encontrar no HGSOE mutação para P53, positividade para P16, WT1 e CK7, alto índice de proliferação medido pelo Ki-67. É comum a expressão de ARID1A e PAX 8. Apresenta receptor de estrogênio positivo, que pode ser visto em 80% dos casos, enquanto receptor de progesterona somente aparece em 30% deles^{1,7}.

Há evidências de um importante papel para p53, reparo de DNA e instabilidade genômica na patogênese do câncer de ovário seroso de alto grau. Mutações em P53 são encontradas em 96% dos casos de câncer de ovário seroso de alto grau, tornando-o um supressor tumoral crítico nesses casos. A perda de p53 é um evento precoce na patogênese do HGSOE. A recombinação homóloga defeituosa desempenha um papel importante na patogênese e na resposta terapêutica desse tipo de câncer, e, juntamente com os defeitos do reparo do DNA, estima-se que esteja presente em 50% dos casos. Os tumores com deficiência de recombinação homóloga são particularmente sensíveis à quimioterapia baseada em platina e aos inibidores da poli ADP ribose polimerase. O câncer de ovário seroso de alto grau também exibe alto grau de alterações somáticas no número de cópias, sugerindo vários processos mutacionais durante sua patogênese¹¹.

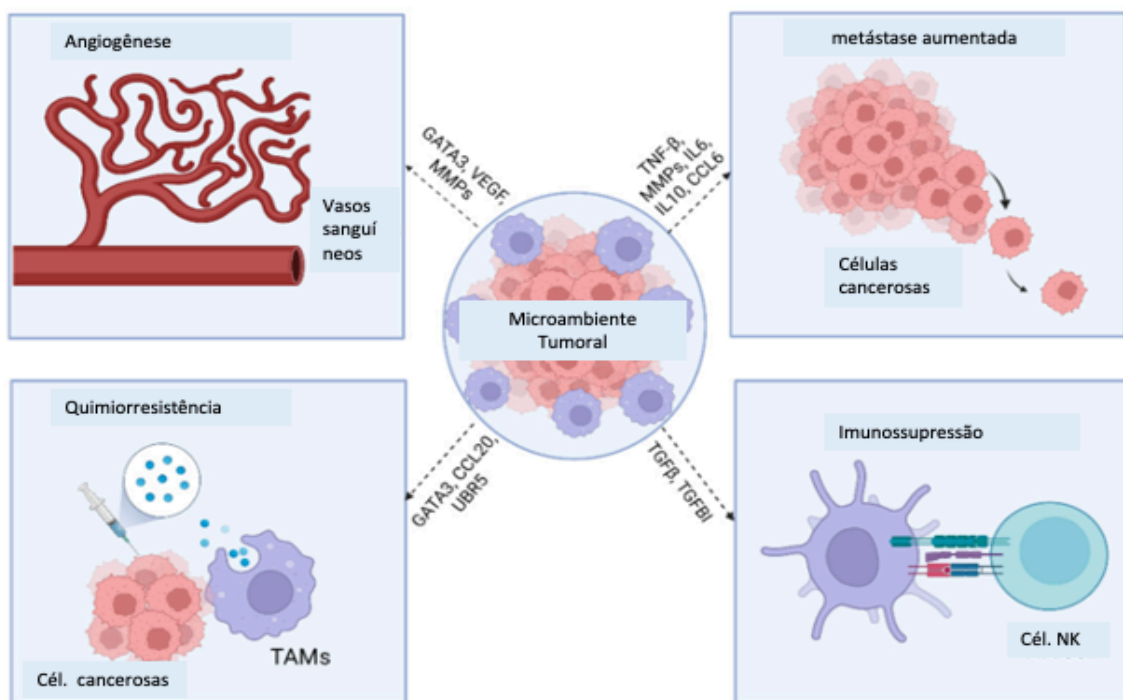
Uma subclassificação molecular de cada histotipo demonstrou um papel decisivo na estratificação prognóstica, onde o HGSOE representaria o histotipo demonstrou um papel decisivo na estratificação prognóstico, onde o HGSOE representaria o histotipo clássico, caracterizado por uma arquitetura papilar, micropapilar e/ou sólida, marcado pleomorfismo nuclear e alto índice mitótico. Além dele, uma variante “SET” (sólido-pseudo endometrióide e transicional), dotada de alto índice mitótico e grande infiltração de TILs e frequente

associação com mutação BRCA1 e 2, e os BRCAmut HGSOCs, mostrando melhor prognóstico em comparação com tumores BRCAwt, particularmente após introdução de PARPi no tratamento de manutenção⁴.

1.2 O Microambiente Tumoral

Atualmente muito se tem pesquisado sobre o microambiente tumoral (TME) e sua influência sobre a patogênese e desfecho da doença. O microambiente tumoral corresponde, além das células tumorais, a tudo o que se associa ao tumor, composto por tecido estromal (que contém células, moléculas e vasos sanguíneos) e por matriz extracelular¹². Portanto, o TME contém, além das células neoplásicas e do estroma circundante (fibroblastos, células endoteliais, pericitos e proteínas da matriz extracelular), células imunes inatas, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células supressoras derivadas da linhagem mielóide, células dendríticas, células NK (natural killer) e células imunes adaptativas (linfócitos T e B)¹³. Ele é responsável por propiciar condições para que o tumor se desenvolva. Esse microambiente vai influenciar o crescimento e propagação tumoral e o próprio tumor também pode modificá-lo em seu favor¹².

Figura 1. Papéis dos macrófagos no microambiente tumoral que aumentam a progressão da malignidade.



Fonte: Schwer, D. et al., 2022. Traduzido pelo próprio autor.

O fundamento dessa teoria foi estabelecido por Paget, quando ele descreveu sua "teoria das sementes e do solo" na década de 1880. A implicação dessa teoria é que, para entender a iniciação e a progressão do câncer, é preciso focar não apenas na célula cancerosa, "a semente", mas também no "solo" em que obtém seus nutrientes, oxigênio e sinais de crescimento e o desenvolvimento; isto é, a metástase do câncer é multifatorial e controlada por fatores externos à própria célula tumoral¹³.”

A identificação das interações entre as células tumorais e o seu microambiente tem atraído o interesse dos pesquisadores, uma vez que trouxe ao conhecimento do meio científico um conceito novo sobre a dinâmica tumoral, antes considerado apenas como uma proliferação desordenada de células geneticamente alteradas. Hoje sabemos que a composição do microambiente tumoral tem vital importância para o desenvolvimento do tumor, influenciando o seu crescimento e disseminação, bem como sua resposta ao tratamento. Trata-se, portanto, importante foco de pesquisa e aquisição de novos conceitos para melhor entendimento da doença, em busca de tratamentos mais eficazes ou mesmo de novas formas de prevenção ou diagnóstico mais precoce¹⁴.

Dentre os tipos celulares presentes nesse microambiente tumoral, as células e mediadores inflamatórios têm demonstrado um papel fundamental na dinâmica tumoral. Essa hipótese foi levantada inicialmente por Virchow em 1863 e tem ganhado importância após o advento da biologia molecular¹³. O microambiente inflamatório produzido no processo de tumorigênese induz instabilidade genômica e aumenta a taxa de alterações moleculares. Sendo assim, um cenário de inflamação crônica produz um microambiente propício para a transformação maligna das células¹⁵. A inflamação está envolvida em todos os estágios de formação do câncer, incluindo iniciação, promoção, desenvolvimento e progressão do EOC¹⁶.

1.3 Tratamento do câncer de ovário

O tratamento padrão atual para o câncer primário de ovário, consiste em cirurgia citorrredutora (que inclui a histerectomia total com salpingooforectomia bilateral associado a linfadenectomia pélvica e para aórtica além da retirada de qualquer lesão tumoral macroscópica) seguido de quimioterapia adjuvante baseada em platina. A citorredução adequada aumenta as chances de resposta à quimioterapia uma vez que remove do microambiente tumoral citocinas imunossupressoras que poderiam interferir negativamente na

resposta ao tratamento. Em alguns casos, no entanto, faz-se necessária a administração de quimioterapia neoadjuvante, quando a doença é considerada irrissecável¹⁷.

A imunoterapia se estabeleceu como uma modalidade terapêutica promissora com sua melhora especificidade e benefícios a longo prazo e menos efeitos colaterais. A terapia de bloqueio de imuno-checkpoints se aplica a muitos tipos de câncer, mas para o carcinoma de ovário ainda mostra baixas taxas de respostas devido à sua heterogeneidade¹⁸.

As oportunidades para explorar terapêuticamente a infinidade de alvos potenciais de checkpoint imunológico trazer dois desafios. O primeiro é a definição de potenciais biomarcadores que podem determinar qual via ou vias de checkpoint imunológico dominam um determinado tumor – isso será crucial para orientar a escolha do inibidor. O segundo desafio é o desenvolvimento clínico de abordagens combinatórias¹⁹.

1.4 Imunologia e o Câncer Ginecológico

Atualmente, a imunoterapia é uma realidade que trouxe vários avanços no controle de doenças graves como o melanoma metastático e o câncer de pulmão avançado. Para os tumores ginecológicos, o FDA aprova tratamento imunoterápico baseado em inibidores de *immune checkpoints*, como nos cânceres com instabilidade de microssatélite ou câncer cervical PD-L1 positivo. Inúmeros estudos têm sido conduzidos, com possíveis mudanças promissoras trazendo novas modalidades terapêuticas para as doenças malignas ginecológicas¹⁵.

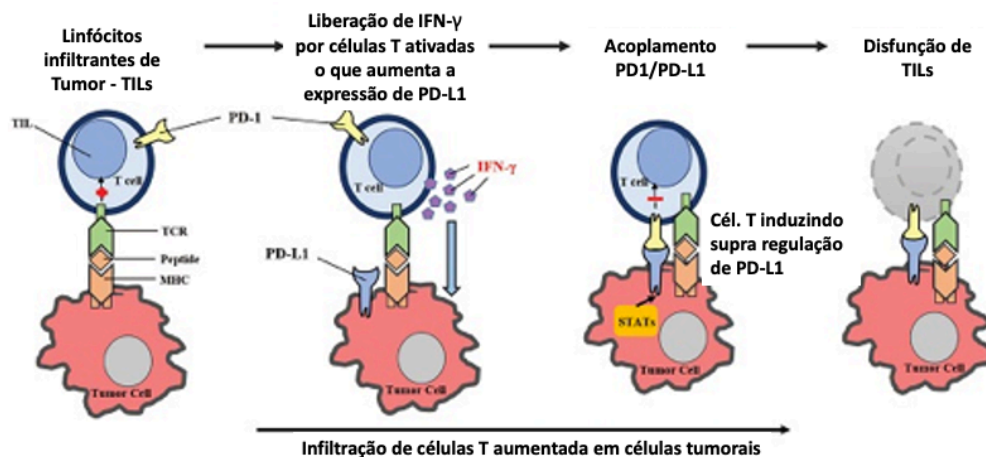
Sabemos que as células imunes em sua heterogeneidade, localização, densidade e funcionalidade influenciam a resposta tumoral ao tratamento e prognóstico. O sistema imunológico não só pode proteger o hospedeiro contra o desenvolvimento do tumor, mas também, ao selecionar tumores de baixa imunogenicidade, tem a capacidade de promover o seu crescimento²⁰. A identificação de alvos a partir de um entendimento melhor da imunologia tumoral poderá ampliar o arsenal terapêutico contra as neoplasias em geral.

Os tratamentos imunoterápicos, baseados nesses conceitos, visam aumentar a resposta imune tumoral ou inibir sinais imunossupressores do microambiente tumoral. Dentre os tratamentos disponíveis atualmente, podemos citar os inibidores de immune checkpoints, as vacinas e a transferência adotiva de células (ACT)²¹.

Os immune checkpoints são regulados por fatores estimulatórios e inibitórios, de forma a manter um equilíbrio do sistema imunológico auxiliando a eliminação de patógenos, mas, ao mesmo tempo, controlando essa resposta imune no sentido de evitar uma hiperestimulação que poderia gerar autoimunidade²¹.

Por resistência imune adaptativa, mediada por sinais inflamatórios do microambiente tumoral, ou por resistência imune inata, por supra regulação oncogênica, a célula tumoral pode superexpressar PD-L1 que propiciará o down regulation das células T efetoras, gerando autotolerância à célula tumoral. Por isso, o uso de anticorpos anti CTLA-4 e anti PD-1/PD-L1 é uma das modalidades terapêuticas da atualidade²¹.

Figura 3. Resistência adaptativa à imunidade tumoral mediada por PD-1/PD-L1.



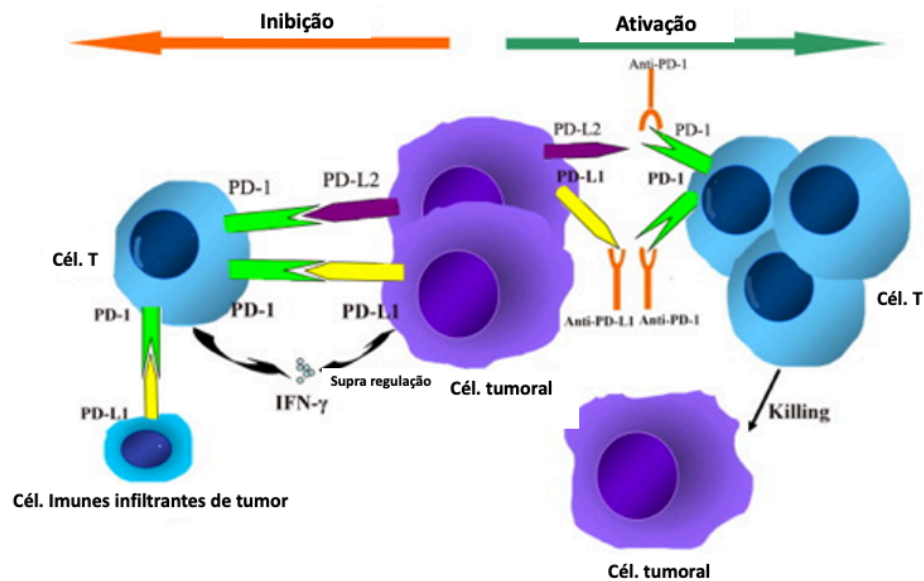
*Após a ativação nos órgãos linfoides, os Teffs específicos do tumor entram no local do tumor para desenvolver TILs. Após o reconhecimento de antígenos tumorais, os TILs liberam citocinas como IFN- γ , que estimula a expressão de PD-L1 no microambiente tumoral. Ao se ligar ao PD-1, o PD-L1 fornece um sinal supressivo às células T e um sinal antiapoptótico às células tumorais, levando à disfunção das células T e à sobrevivência do tumor.

Legenda: PD-1: proteína de morte programada PDL-1: ligante de PD1; TIL: linfócito infiltrante de tumor.; IFN- γ : interferon gama

Fonte: Ghosh C., et al., 2021. Traduzido para o português pelo próprio autor.

Evidências de que o câncer de ovário é um tumor com alta expressão de PD-L1, sendo essa expressão associada a pior sobrevida e com alta prevalência de linfócitos intraepiteliais tumorais (TIL) e grupos selecionados com alta carga de neoantígenos, faz com que a imunoterapia, seja por qualquer uma das técnicas descritas anteriormente, tenha uma grande possibilidade de ser empregada, com resultados potencialmente promissores¹⁵.

Figura 4. O mecanismo de bloqueio de checkpoint anti-PD-1 e anti-PD-L1.

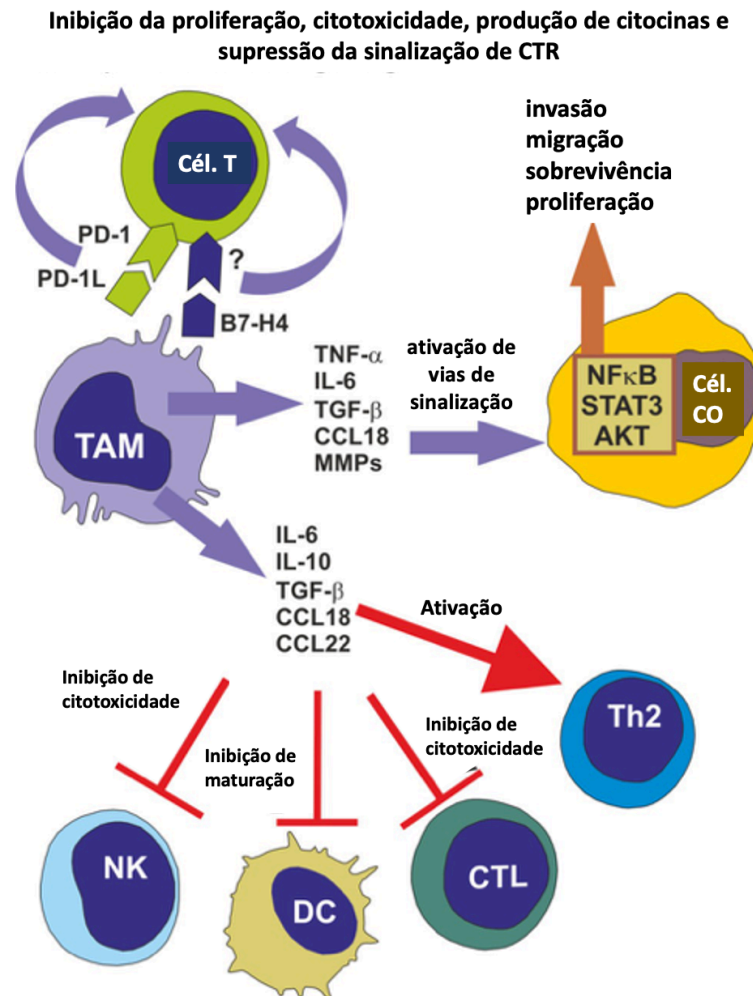


PD-1 é expresso por células T. PD-L1 é expresso em células tumorais e células imunes infiltrantes do tumor. A combinação de PD-1 e PD-L1/PD-L2 contribui para a supressão da função das células T. A inibição da interação de PD-1 e seus ligantes pode aumentar significativamente a função das células T, resultando em atividade antitumoral.

Fonte: Meng X et al., 2015. Traduzido para o português pelo próprio autor.

Outro tipo celular pertencente à imunidade inata com importante papel no câncer de ovário, são os macrófagos. Eles fagocitam e destroem os microorganismos invasores. Também liberam citocinas e quimiocinas para recrutar outras células do sistema imunológico para o local da inflamação. Favorecem a ativação do sistema imune adaptativo através da expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs. Atraídos por citocinas e quimiocinas, os monócitos se diferenciam no tecido tumoral em macrófagos associados ao tumor (TAMs). Os TAMs podem assumir o fenótipo M1 anti-tumorigênico ou M2 pró-tumorigênico¹⁵.

Figura 5. Envolvimento de TAMs do tipo M2 na progressão do câncer de ovário.



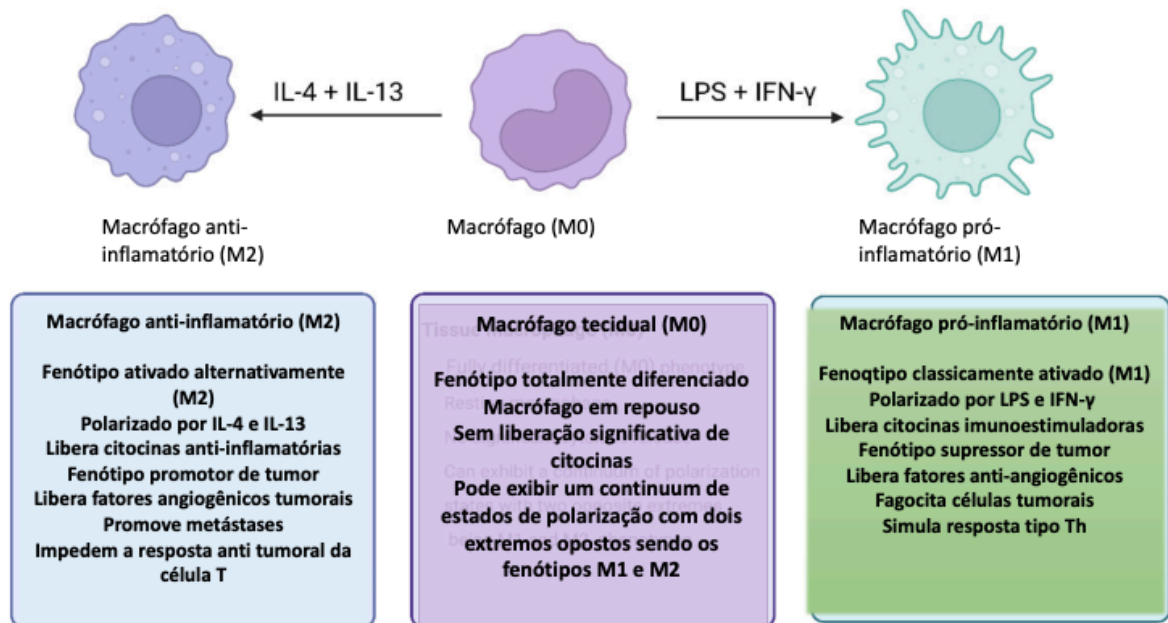
*Os TAMs liberam uma variedade de fatores solúveis responsáveis pela ativação de várias vias de sinalização em células de câncer de ovário (CEO), promovendo sua sobrevivência, proliferação, migração e invasividade. As citocinas liberadas por TAMs prejudicam a atividade de células imunes, incluindo células dendríticas (DC), células natural killer (NK) e células T citotóxicas (CTL), bem como induzem a atividade de células Th2. A interação direta de TAMs e células T via PD-L1 e B7-H4 inibe a função das células T, resultando no escape imune das células CEO.

Fonte: Nowak M. et al., 2020. Traduzido para o português pelo próprio autor.

Citocinas presentes no TME (TGF- β por exemplo), podem distorcer a diferenciação dos macrófagos para o fenótipo M2, geralmente associado a baixa concentração de IL-12 e alta concentração de IL-10. Esses macrófagos migram para áreas hipóxicas dentro do tumor e promovem a progressão tumoral por indução de angiogênese, remodelação da matriz

estromal, inibição de apoptose, supressão da imunidade adaptativa e indução de células T reguladoras (Treg)^{13,15}.

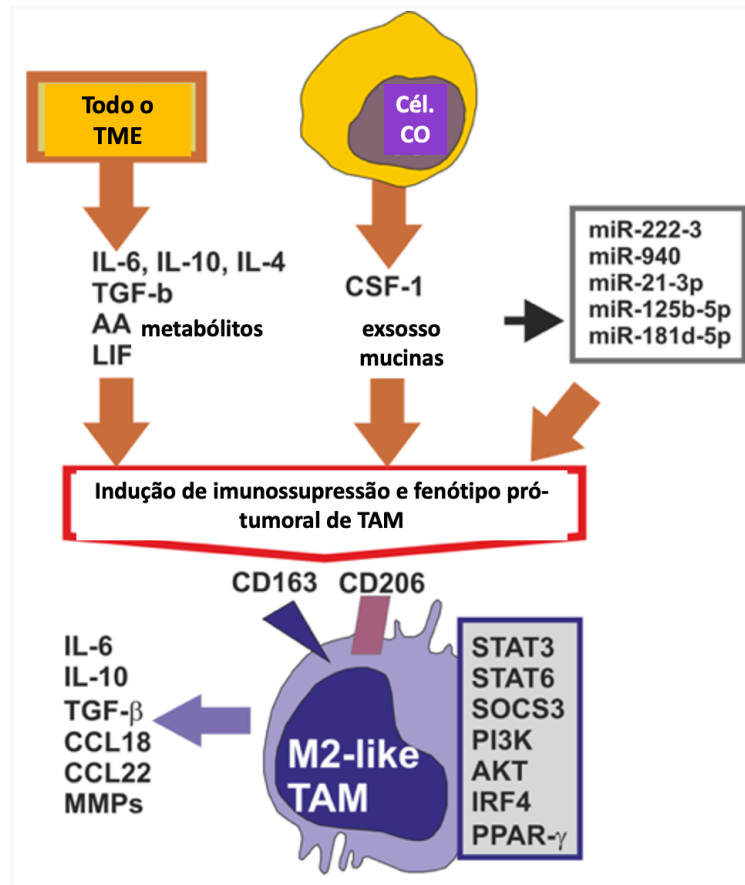
Figura 6. Comparação das diferenças entre macrófagos M1 e M2.



Fonte: Schwer, D. et. al., 2022. Traduzido para o português pelo próprio autor.

Isso permite que as células tumorais escapem para o estroma circundante e, por fim, metastatizem para locais distantes. A distorção farmacológica da polarização de macrófagos do fenótipo M2 para M1 provavelmente proporcionará benefícios terapêuticos para pacientes com câncer^{15,22}.

Figura 7. Indução de TAMs do tipo M2 no microambiente tumoral de câncer de ovário.



*Os fatores solúveis liberados por células de câncer de ovário (CEO) e outras células do microambiente tumoral (TME) polarizam os TAMs em fenótipo semelhante ao M2 imunossupressor. Os TAMs do tipo M2 caracterizam-se pela expressão de superfície dos receptores CD163 e CD206, superexpressão de várias proteínas de sinalização intracelular e produção de fatores imunossupressores e pró-angiogênicos e pró-invasão.

Fonte: Nowak M. et al., 2020. Traduzido para o português pelo próprio autor.

Não menos importante, os linfócitos, pertencentes ao sistema imune adaptativo, também participam ativamente do controle imunológico no EOC. Nos LNs de drenagem de tumor, as células T são ativadas pelo antígeno tumoral. Isso resulta na expansão clonal e na diferenciação de células T nos nódulos linfáticos em células T efetoras (células T auxiliares CD4⁺ ou células T citotóxicas CD8⁺). Dependendo do meio de citocinas e dos fatores de transcrição no TME, as células T auxiliares CD4⁺ se diferenciam em vários subtipos. Essas células T auxiliares secretam citocinas e quimiocinas que regulam a resposta imune. As células Th1 favorecem a imunidade mediada por células pela ativação de células T CD8 para montar uma resposta imune contra patógenos intracelulares, enquanto as células Th2

favorecem a imunidade humoral pela ativação de células B contra parasitas extracelulares. Por outro lado, células T efectoras CD8⁺ ativadas por apresentação de antígeno na molécula MHC classe I ou através de células T auxiliares CD4 são diretamente citotóxicas. Assim, eles migram para o tumor e destroem as células tumorais. Além disso, algumas das células T e B ativadas se diferenciam em células de memória que são responsáveis pela memória imunológica de longa duração. A exposição subsequente ao mesmo antígeno resulta em uma resposta imune mais rápida e robusta¹⁵.

A regulação da resposta das células T é um equilíbrio delicado entre os sinais co-estimulatórios e inibitórios que servem como pontos de verificação imunológicos. Em condições fisiológicas normais, esses receptores de células T servem para manter a homeostase imunológica e prevenir a autoimunidade. As células T ativadas expressam simultaneamente CTLA-4 e PD-1 em sua superfície como pontos de verificação imunológicos. O efeito estimulador das células T é contrabalançado por um mecanismo supressor para manter a homeostase imunológica. Além dos pontos de controle imunológico, um dos principais contribuintes para esse efeito imunossupressor são as células T reguladoras (Tregs), que são células T especializadas que suprimem a função citotóxica de outras células T. Eles são classificados como Tregs naturais derivados do timo (nTregs) e Tregs indutíveis derivados periféricamente (iTregs). A diminuição da atividade das células Treg aumenta as respostas imunes inatas e adaptativas, que podem ser utilizadas para tratar o câncer. Assim, em condições normais, a regulação coordenada da ativação imune e das vias supressivas desempenham um papel importante na manutenção da tolerância periférica e na regulação da amplitude e duração das respostas das células T¹⁵.

2. JUSTIFICATIVA

O perfil imunológico do tumor e todas as suas interações no microambiente tumoral, não somente influenciam na progressão da doença como também se relacionam com uma série de eventos genéticos e epigenéticos que terão impacto na resposta ao tratamento e sobrevida. Sendo assim, o melhor conhecimento do comportamento biológico do tumor e suas interações no microambiente tumoral tornam-se cruciais para desenvolver técnicas mais sensíveis para um diagnóstico precoce e terapêuticas mais assertivas, sempre em busca de melhores prognósticos.

O desenvolvimento do câncer e sua resposta à terapia são fortemente influenciados pela imunidade inata e adaptativa, que promovem ou atenuam a tumorigênese e podem ter

efeitos opostos no resultado terapêutico²³. Os tumores geralmente surgem no local da inflamação crônica²⁴. Cada vez fica mais claro que o microambiente tumoral, que é amplamente orquestrado por células inflamatórias, é um participante indispensável no processo neoplásico, promovendo proliferação, sobrevivência e migração²⁵.

No câncer de ovário, a maioria das pacientes respondem ao tratamento primário. No entanto, quase 80% desses pacientes com doença avançada terão recidiva e a recorrência é frequentemente incurável²⁶. Por isso, a busca incessante por novas terapias e biomarcadores que possam impactar em prognóstico.

A imunoterapia tumoral tem sido considerada uma modalidade alternativa no tratamento de tumores sólidos, incluindo câncer de ovário. Além disso, vários estudos recentes mostraram uma associação entre células imunes infiltrantes de tumor e resultados clínicos²⁷.

As células cancerosas também podem usar as vias de checkpoint imunológico para escapar do ataque imunológico antitumoral. Neste sentido, a proteína de morte programada 1 (PD-1) e seus ligantes de morte programada-ligante 1 (PD-L1) e ligante 2 (PD-L2) são importantes nesse contexto. O bloqueio dessas proteínas pode remover os sinais inibitórios desencadeando uma resposta imune antitumoral. A partir de 2009, uma análise estatística do câncer renal previu um pior prognóstico em relação aos tumores que apresentavam PD-L1 negativo ou subexpresso. Estudos recentes vêm indicando que os níveis de expressão de PD-L1 podem ajudar a prever a sobrevida do paciente para vários tumores. Nos últimos anos, a imunoterapia anti-PD-1/PD-L1 vem mostrando resultados positivos em aplicações clínicas por induzir a regressão do crescimento tumoral e metástase²⁸.

No entanto, os anticorpos que bloqueiam os "checkpoints" imunológicos não têm como alvo as células tumorais diretamente, mas sim os receptores de linfócitos ou seus ligantes, aumentar a atividade antitumoral endógena¹⁹. Os inibidores de immune checkpoints revolucionaram a terapia do câncer, mas ainda existem limitações, pois os immune checkpoints ao aumentar a função efetora e reverter a exaustão de células T para eliminar células tumorais, quebram de forma não seletiva a autotolerância para tecidos saudáveis e levam a um espectro único de eventos adversos relacionados ao sistema imunológico²⁹. Dessa forma, a evidência de reais benefícios de novas propostas terapêuticas faz-se necessário, de forma que justifique os riscos a elas associados.

Sendo assim, a proposta deste estudo é caracterizar o perfil imunológico das pacientes com carcinomas serosos de alto grau e avaliar sua relação com a resposta ao tratamento e

sobrevida, contribuindo para o melhor entendimento da doença e auxiliando no desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil imunológico das pacientes com carcinomas serosos ovarianos de alto grau, bem como avaliar sua relação com resposta a tratamento convencional padrão e sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os carcinomas serosos de alto grau das pacientes atendidas no Instituto Mário Penna, obtidos através de análise de prontuário médico, através dos achados clínico-patológicos (tais como: grau histológico do tumor, estadiamento, níveis de Ca 125, invasão linfovascular, citorredução, sensibilidade à platina, tempo de sobrevida global e sobrevida livre de doença).
- Analisar a expressão dos marcadores imunológicos CD8+, CD4+, CD68+ e MAC387+, no microambiente tumoral de espécimes cirúrgicos de câncer de ovário (tecido ovariano tumoral);
- Analisar a expressão dos *imuno checkpoints* inibidores de resposta PD-L1 e PD-L2 no microambiente tumoral de espécimes cirúrgicos de câncer de ovário (tecido ovariano tumoral);
- Comparar os dados clínico-patológicos e imunológicos entre pacientes que responderam ou não ao tratamento quimioterápico adjuvante.
- Relacionar esse perfil imunológico com citorredução e sobrevida.

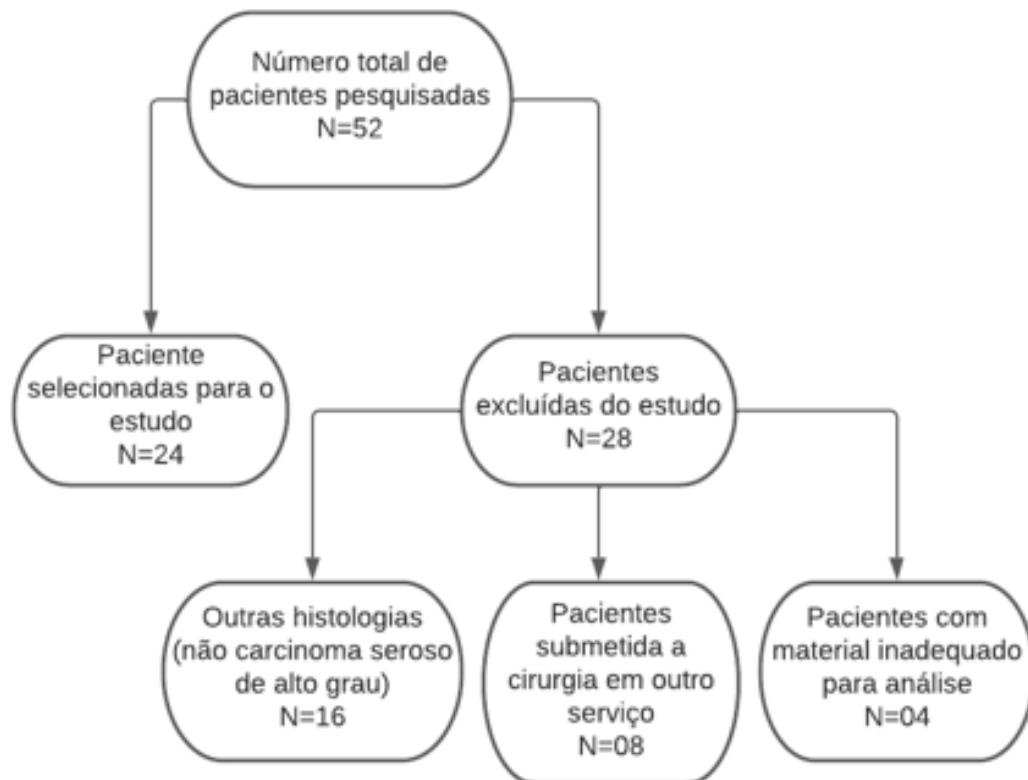
4. SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E TAMANHO AMOSTRAL

Trata-se de um estudo retrospectivo em que foram levantados prontuários de 52 pacientes com diagnóstico de câncer de ovário, atendidas no Instituto Mário Penna, entre os anos de 2015 e 2019, submetidas ao tratamento padrão com citorredução e quimioterapia adjuvante baseado em platina ou quimioterapia neoadjuvante baseado em platina para os casos de doença avançada sem possibilidade de ressecção ótima como tratamento primário. Desse total, 24 pacientes foram selecionadas para o estudo, todas com histologia de carcinoma

seroso de alto grau nos estágios I a IV. Outras 28 pacientes foram excluídas pelos motivos descritos a seguir: 16 pacientes com histologia diferente do carcinoma seroso de alto grau, 08 pacientes que foram operadas em outro serviço (com perda de seguimento) e outras 04 pacientes cujo material (lâminas e parafina) não apresentava condições adequadas para processamento. As pacientes foram divididas de acordo com a Figura 8.

Figura 8. Critérios de seleção das pacientes com CEO para estudo.



Fonte: autoria do próprio autor.

O número de pacientes previstas para este estudo se baseia na média de pacientes com neoplasia de ovário atendidas na instituição, nos últimos 3 anos, segundo dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC) do IMP, portanto não foi realizado cálculo amostral, sendo considerada a amostragem por conveniência.

As pacientes foram divididas em 2 grupos conforme a susceptibilidade ao tratamento quimioterápico. A resposta ao tratamento quimioterápico seguiu os conceitos pré-definidos pela literatura médica mundial, na época do tratamento, sendo possíveis as seguintes situações: (a) resposta clínica completa (RCC), quando após 6 meses de tratamento com quimioterapia baseado em platina a paciente apresenta alívio dos sintomas, normalização do

biomarcador sérico CA125 e ausência de imagens suspeitas de neoplasia em avaliações trimestrais consecutivas. Nesse caso a paciente também é considerada platino sensível; (b) resposta clínica parcial (RCP), ao apresentar recidiva da doença em intervalo inferior a 6 meses do tratamento ou quando a doença progride durante o tratamento ou quando doença estável foi a melhor resposta. Nesse caso, são também consideradas como refratárias a platina ou platino-resistentes. O critério de citorredução ótima foi definido como a permanência de doença residual macroscópica menor do que 1,0 cm, após a cirurgia primária.

O estadiamento do carcinoma ovariano foi estabelecido com base em dados do prontuário médico, obedecendo a classificação da Federação Internacional de Ginecologia Obstetrícia (FIGO) de 2014 (Tabela 1).

A análise e quantificação dos biomarcadores imunológicos no microambiente tumoral foi realizada através de imuno-histoquímica em lâminas histológicas contendo tecido tumoral ovariano, cedidas pelo setor de Anatomia Patológica do Hospital Luxemburgo e do Instituto Mário Penna, para todas as pacientes incluídas no estudo.

Este estudo foi conduzido respeitando o princípio do sigilo médico sendo utilizados apenas para a finalidade do estudo, preservando a identidade das pacientes. Por se tratar de estudo retrospectivo não houve nenhum prejuízo para as pacientes, visto que o tratamento ao qual foram submetidas em nada foi modificado em consequência do estudo em questão.

Tabela 1. FIGO 2014 - Estadiamento do Câncer de Ovário

Estadio I	Tumor confinado aos ovários
IA	Tumor limitado a 1 ovário, cápsula intacta, sem tumor na superfície, lavado peritoneal negativo
IB	O tumor envolve ambos os ovários, como IA
IC	Tumor limitado a 1 ou ambos os ovários
IC1	Ruptura no ato cirúrgico
IC2	Ruptura da cápsula antes da cirurgia ou tumor na superfície ovariana
IC3	Células malignas na ascite ou lavado peritoneal
Estadio II	O tumor envolve 1 ou ambos os ovários com extensão pélvica ou câncer peritoneal primário
IIA	Extensão e/ou implante no útero e/ou trompas de Falópio
IIB	Extensão para outros tecidos intraperitoneais pélvicos
Estadio III	O tumor envolve 1 ou ambos os ovários com disseminação citológica ou histologicamente confirmada para o peritônio fora da pelve e/ou metástase para os linfonodos retroperitoneais

III A	Linfonodos retroperitoneais positivos e/ou metástases microscópicas além da pelve
III A1	Apenas gânglios linfáticos retroperitoneais positivos
III A1(i)	Metástases menor ou igual a 10 mm Metástase > 10 mm
III A1(ii)	
III A2	Envolvimento peritoneal microscópico, extra pélvico com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos
III B	Metástases macroscópicas, extrapélvicas e peritoneal menor ou igual a 2cm com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos. Inclui extensão para cápsula de fígado/baço
III C	Metástases macroscópicas, extrapélvicas e peritoneal > 2cm com ou sem linfonodos retroperitoneais positivos. Inclui extensão para cápsula de fígado/baço
Estadio IV	Metástases à distância, excluindo metástases peritoneais
IV A	Derrame pleural com citologia positiva
IV B	Metástase parenquimatosa hepática e/ou esplênica, metástase para órgãos extra-abdominais (incluindo linfonodos inguinais e linfonodos fora da cavidade abdominal)

Fonte: criado pelo próprio autor.

4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS, LINFÓCITOS T CD8+, T CD4+, E MACRÓFRAGOS CD68+, L1/MAC 387+, E DOS *IMMUNE CHECKPOINTS* PD-L1 E PD-L2

Secções histológicas de amostras de câncer de ovário seroso de alto grau, incluídas em parafina, foram cortadas a 3 µm de espessura em micrótomo e, em seguida, colocadas em lâminas polarizadas. Para cada paciente, foram preparadas 6 lâminas com os marcadores propostos para o estudo. Um total de 144 lâminas foram analisadas conforme metodologia previamente descrita. As amostras foram processadas no laboratório de pesquisa translacional do Instituto, responsável pelo fornecimento do painel de marcadores, arrecadados por financiamento pelo Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON).

Para realização da técnica de imuno-histoquímica (IHQ), os cortes foram desparafinados em dois banhos com xilol, durante 30 minutos cada, e hidratados em ordem decrescente de álcoois, do absoluto ao 70%, durante 5 minutos cada, finalizando com banho em água corrente por 5 minutos. A reativação antigênica foi realizada com solução tampão citrato, pH= 6,0 a 10%, em banho maria a 97°C durante 30 minutos e resfriadas. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com uma solução contendo 45 ml de metanol, 1.5 ml de H₂O_d, 3 ml de H₂O₂ foi durante 30 minutos. Em seguida, foram realizados 2 banhos de PBS

1x de 5 minutos cada. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com leite em pó desnatado, 24%, diluído em PBS 1X, em temperatura ambiente durante 30 minutos com dois banhos de PBS 1x durante 5 minutos cada, em seguida. Para a incubação dos anticorpos primários, eles foram diluídos previamente (Tabela 2) e, na sequência, foram aplicados em cada lâmina até encobrir os cortes e incubados em câmara úmida por 18h a 4°C, overnight. No segundo dia, a câmara úmida foi posta em temperatura ambiente durante 20 minutos e em seguida as lâminas foram lavadas em PBS1x ,dois banhos de 5 minutos, secadas e então o sistema de detecção HRP (Hidex- Cell Marque®) foi aplicado nos cortes: anticorpo secundário anti-mouse e rabbit e o polímero HRP durante 30 minutos, respectivamente. Os cortes foram novamente lavados em PBS 1x, dois banhos de 5 minutos. Para a revelação, os cortes foram encobertos com cromógeno DAB (3,3'-Diaminobenzidina- Cell marque), durante 5 minutos. Posteriormente, foram lavados em água corrente durante 5 minutos e então contra-corados com hematoxilina de Harris. Na sequência, as lâminas foram desidratadas em álcoois crescentes, do 70% ao álcool absoluto, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan®.

Tabela 2. Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas

Anticorpos	Clone	Diluições	Fabricante
CD4+	SP35	1:200	Cell Marque
CD8+	SP16	1:250	Cell Marque
PD-L1	P5	1:250	Thermo Fisher
PD-L2	PA5	1:100	Thermo Fisher
L1/MAC 387 +	MAC 373	1:100	DAKO
CD68+	ab955	1:100	abcam

Fonte: criado pelo próprio autor.

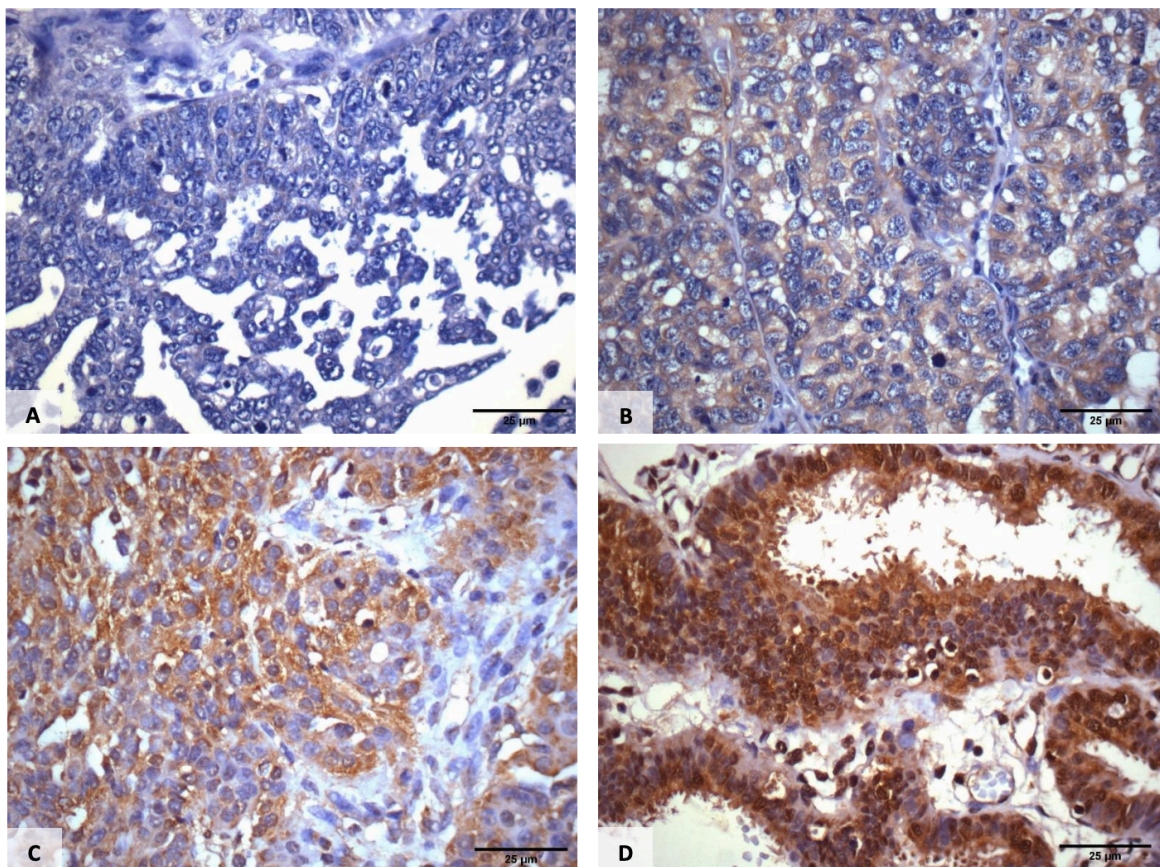
4.3 ANÁLISE DOS DADOS

Para a realização das análises morfométricas foram capturadas 20 imagens de cada lâmina para os marcadores CD8+, CD4+, CD68+ e L1/MAC 387+, na objetiva de 400x. Desta forma, todo o corte histológico foi capturado em microscópio óptico de captura (NIKON Eclipse CI M568F).

As análises morfométricas destes marcadores imuno-histoquímicos foram realizadas com auxílio do software Image J, disponível em <https://imagej.net/software/fiji/downloads>, onde as células expressando esses marcadores foram contadas em toda área contendo tumor, considerando as regiões intra tumorais e estromais .

De acordo com as orientações do fabricante e segundo os autores^{30,31}, que utilizaram o mesmo clone, e mesma fabricante dos marcadores, para as análises dos marcadores PD-L1 e PD-L2 (*immune checkpoints*) foi realizada uma avaliação semi-quantitativa para criação de um *score*: (0) para as lâminas não marcadas; (1) para as marcações discretas; (2) marcações moderadas e (3) marcações intensas (Figura 09 e 10).

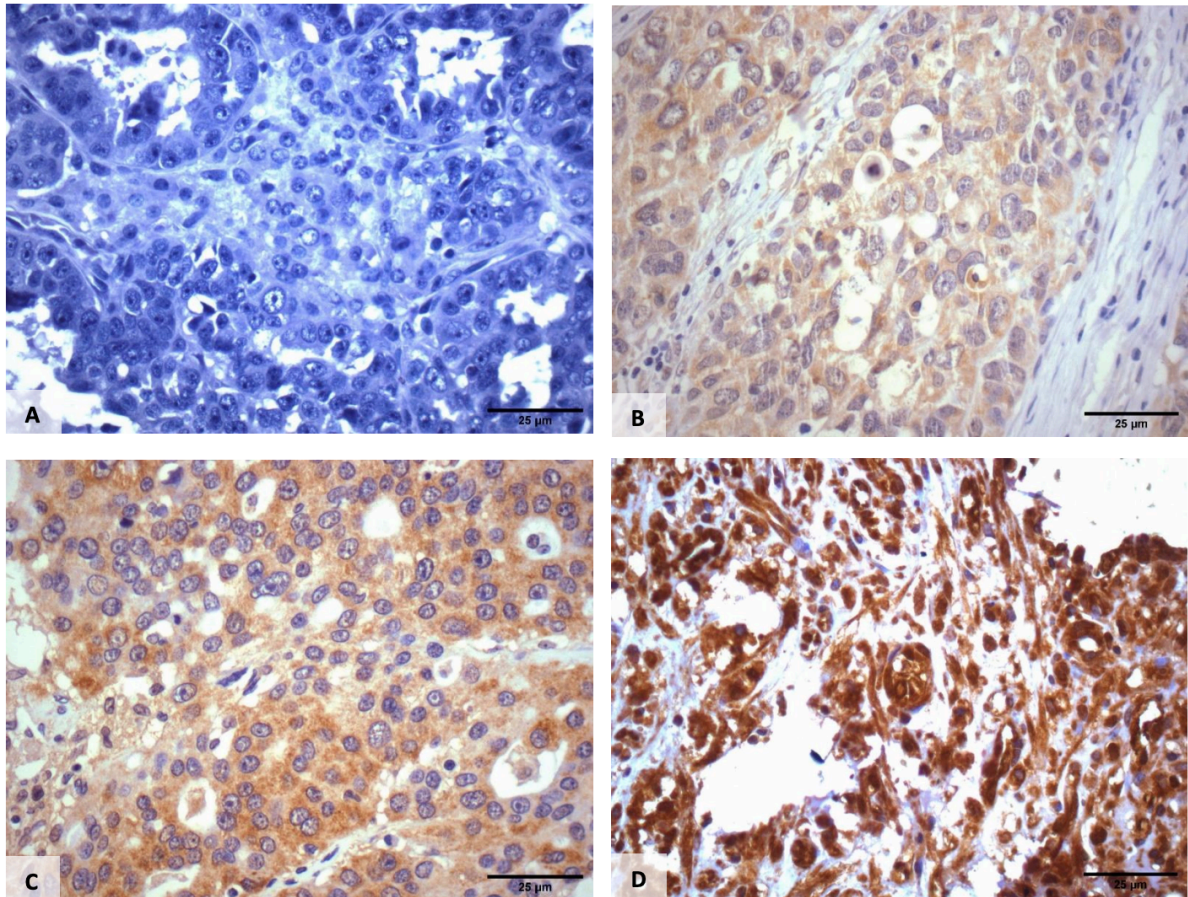
Figura 9. Imuno-histoquímica do ligante-1 de morte celular programada (PD-L1) em secções histológicas de câncer de ovário seroso de alto grau (HGSC).



A intensidade da coloração de PD-L1 foi classificada em quatro níveis de acordo com a imunomarcagem das células do parênquima neoplásico: (A) amostra de tecido classificada como não corada – negativa; (B) fracamente corada; (C) moderadamente corada e (D) fortemente corada (ampliação, $\times 400$).

Fonte: criado pelo próprio autor.

Figura 10. Imuno-histoquímica do ligante-2 de morte celular programada (PD-L2) em secções histológicas de câncer de ovário seroso de alto grau.



A intensidade da coloração de PD-L2 foi classificada em quatro níveis de acordo com a imunomarcagem das células do parênquima neoplásico: (A) amostra de tecido classificada como não corada – negativa; (B) fracamente corada; (C) moderadamente corada e (D) fortemente corada (ampliação, $\times 400$).

Fonte: criado pelo próprio autor.

Finalmente, foram realizadas associações entre as células inflamatórias e imunológicas caracterizadas através da avaliação imuno-histoquímica para marcadores de linfócitos T (CD8+ e CD4+) e macrófagos (CD68+ e L1/MAC387+) e a expressão dos imunocheckpoints inibidores de resposta PD-L1 e PD-L2 e os parâmetros clínico-patológicos, tais como: citorredução cirúrgica (ótima ou subótima), sensibilidade à platina (platino sensível ou platino resistente), e ocorrência de óbito. Também foram feitas associações entre as razões de

alguns destes marcadores (CD8+/CD4+; CD8+/CD68+ e CD8+/L1/MAC387+) com os mesmos dados clínico-patológicos.

Os dados obtidos foram analisados no software IBM SPSS versão 25. Dados quantitativos foram submetidos ao teste de de Shapiro Wilk que identificou não normalidade. Comparações de platina, óbito e citorredução em relação aos marcadores foram feitas pelo teste de Mann Whitney. Para a análise das associações de PDL1 e PDL2 com platina, óbito e citorredução foi utilizado o teste Qui quadrado. O nível de significância das análises é de 5%.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e aprovado em 30 de outubro de 2020, pelo parecer de número 4.373.310, sob o número CAAE: 36558720.1.1001.5149 (Anexo A).

4.5 FINANCIAMENTO E CRÉDITOS SUPORTE E APOIO TÉCNICO

Instituto Mário Penna (IMP), responsável pelo fornecimento do painel de marcadores, arrecadados por financiamento pelo Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

As pacientes no estudo, apresentaram média de idade de 58 anos com uma maior prevalência do HGSCO a partir da quinta década de vida, paridade variando de 2 a 4 gestações, estando 58% delas já em fase de pós menopausa. A maioria apresentava doença avançada já ao diagnóstico (estádios III-IV) e com presença de ascite (69,0% e 62,5%, respectivamente). A alta titulação do marcador Ca 125 ainda no momento do diagnóstico, denota sua clara relação com doença avançada, como evidenciado na Tabela 3.

A citorredução ótima foi possível em apenas $\frac{1}{4}$ dos casos, o que reforça mais uma vez a grande quantidade de casos diagnosticados em fase tardia. Quase $\frac{3}{4}$ dos casos (70,8%) foram considerados sensíveis à platina, porém, o número de recorrências e de pacientes com doença em progressão, após tratamento padrão, é de aproximadamente 80%, reafirmando a característica agressiva da doença. Vícios como etilismo e tabagismo não foram prevalentes entre as pacientes estudadas. A Figura 11 mostra a curva de sobrevida livre de progressão das

pacientes. Observou-se que todas as participantes que morreram, o fizeram antes de 20 meses de SLP.

Tabela 3. Características gerais da população estudada

	N	%
Idade		
<40 anos	01	4,16
40-49 anos	05	20,83
50-59 anos	06	25,0
>60 anos	12	50,0
Paridade		
Desconhecida	02	8,33
0-2	12	50,0
3-4	06	25,0
>=5	04	16,66
Ca 125		
< 35 (normal)	02	8,33
35-300	02	8,33
301-1000	07	29,16
>1000	13	54,16
Resposta à platina		
Sensível	17	70,83
Resistente	07	29,16
Citorredução		
Ótima	06	25,0
Subótima	16	66,66
Não descrita	02	8,33
Estadio		
I-II	05	20,83
III-IV	19	79,16
Ascite		
Sim	15	62,5
Não	08	33,33
Não mensurado	01	4,16
Invasão Linfovascular		
Sim	19	79,16
Não	01	4,16
Não mensurado	04	16,66
Recorrência		

Sim	12	57,14
Não	09	42,8
Progressão		
Sim	07	29,16
Não	17	70,83
Menopausa		
Sim	14	58,33
Não	08	33,33
Não informado	02	8,33
Etilismo		
Sim	01	4,16
Não	20	83,33
Não informado	03	12,5
Tabagismo		
Sim	02	8,33
Não	19	79,16
Não informado	03	12,5
Óbito		
Sim	10	41,66
Não	14	58,33
Sobrevida Global em Meses		
< 36 meses	14	58,33
> 36 meses	10	41,66
Sobrevida Livre de Progressão em Meses		
0 meses	6	25,0
1 a 12 meses	8	33,33
13 a 24 meses	4	16,66
> 24 meses	6	25,0

Fonte: criado pelo próprio autor

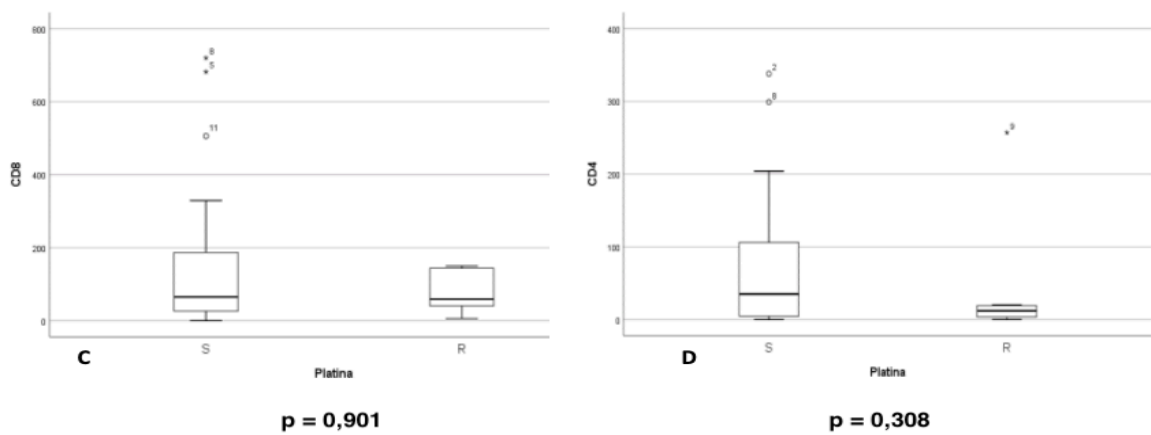
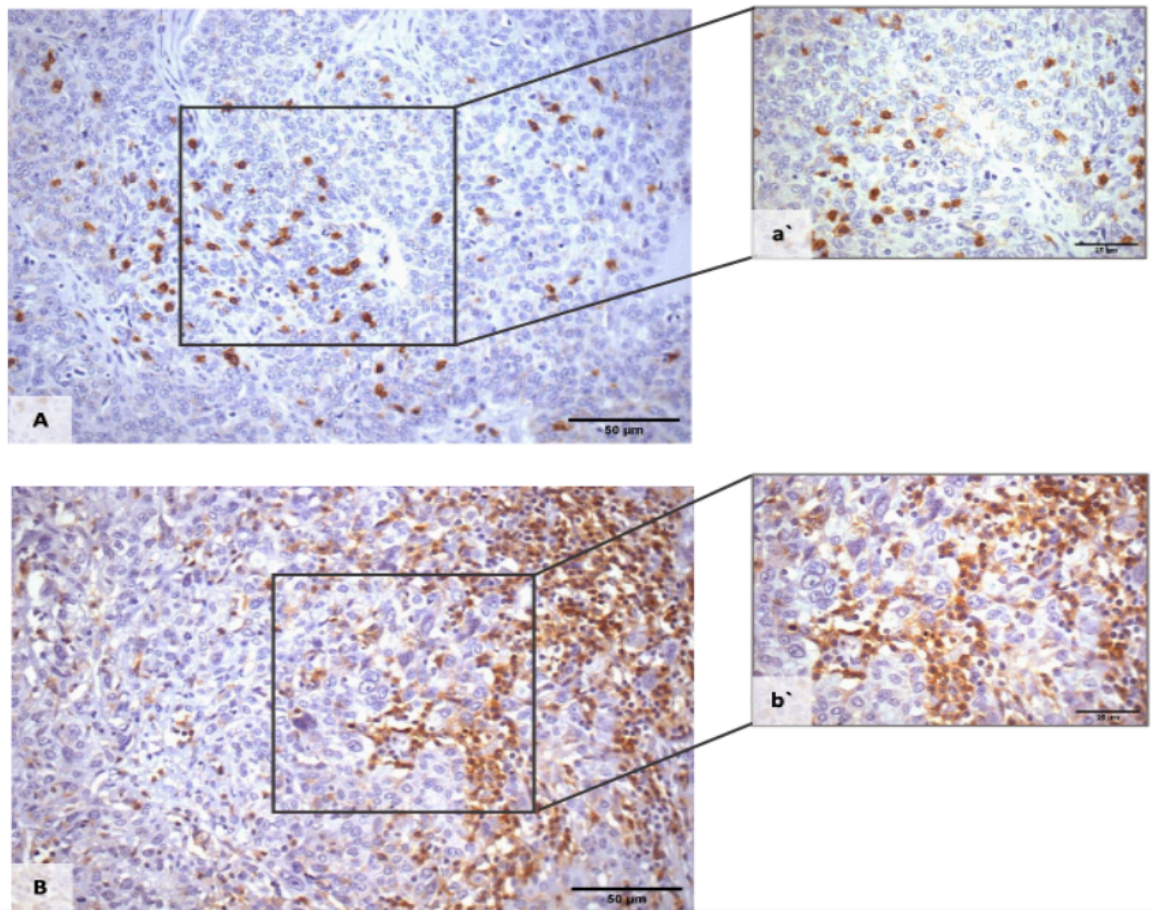
5.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS LINFÓCITOS

T CD8+, T CD4+, e macrófagos CD68+, L1/MAC 387+

A Figura 12 ilustra a marcação obtida para os linfócitos do microambiente tumoral imunomarcados para TCD8+ (Figura 12A) e TCD4+ (Figura 12B) em amostras de pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau (HGSCO) sensíveis ao tratamento com platina. Na análise morfométrica da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos da resposta imunológica das pacientes observamos um aumento da expressão dos marcadores de linfócitos TCD8+ (Figura 12C) e linfócitos TCD4+ (Figura 12D) naquelas pacientes

consideradas sensíveis à platina. Contudo, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

Figura 11. Imagem representativa da quantificação dos linfócitos intratumorais (TIL) imunomarcados para CD8+ e CD4+ em amostras de câncer de ovário seroso de alto grau (HGSC) em pacientes sensíveis ao tratamento com platina.

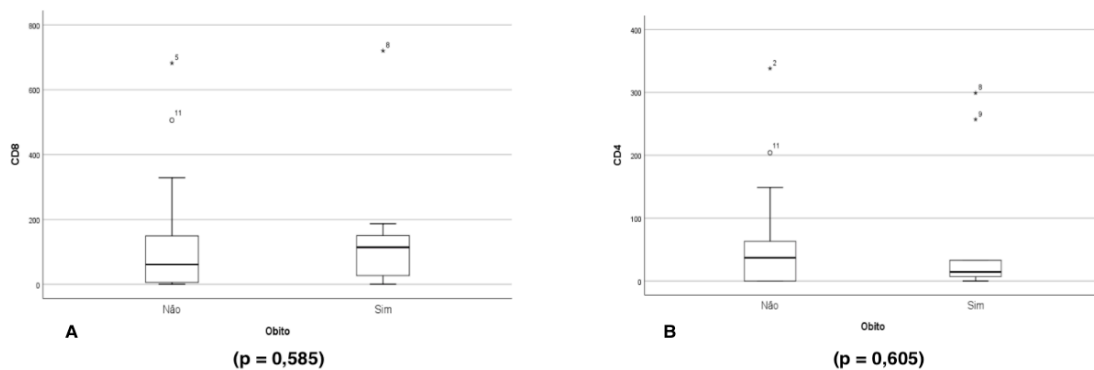


A) Imunoexpressão de LTCD8+. Em detalhe (a') observar infiltração intratumoral e estromal. (A - escala barra: 50 μ m, ampliação, \times 200; a' - escala barra: 25 μ m, ampliação, \times 400). B) Imunoexpressão de LTCD4+. Em detalhe (b') observar infiltração intratumoral e estromal. (B - escala barra: 50 μ m, ampliação, \times 200; b' - escala barra: 25 μ m, ampliação, \times 400). C) Análise morfométrica de LTCD8+ em pacientes sensíveis e resistentes à platina. D) Análise morfométrica de LTCD4+ em pacientes sensíveis e resistentes à platina. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos, considerando $p < 0,05$. Paciente sensível à platina (n=17), paciente resistente a platina (n=07).

Fonte: criado pelo próprio autor.

Ao analisar a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos da resposta imunológica das pacientes em relação a óbito, percebe-se uma distribuição bastante homogênea em relação à expressão do marcador TCD8+ para ambos os grupos, não sendo possível identificar diferença entre eles (Figura 13A). Para os linfócitos TCD4+ (Figura 13B) comparativamente, o grupo de pacientes que tiveram óbito apresentou níveis mais baixos deste marcador. Para ambos os marcadores, no entanto, os dados não atingiram significância estatística.

Figura 12. Análise morfométrica de LTCD8+ e LTCD4+ em relação a óbito.



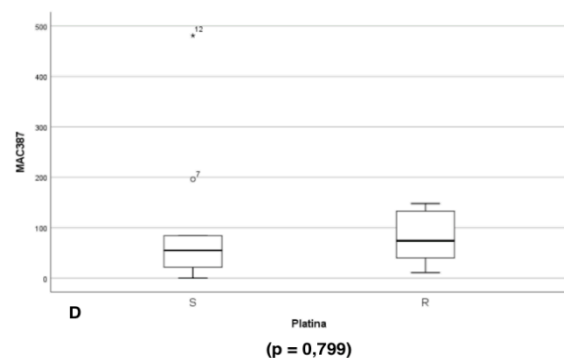
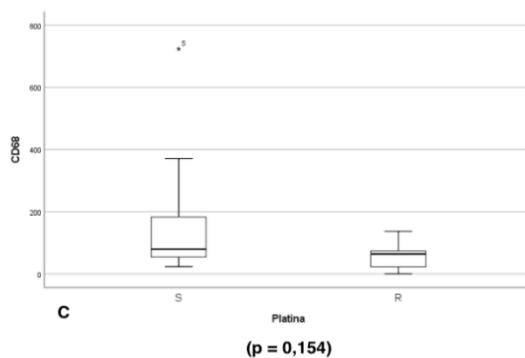
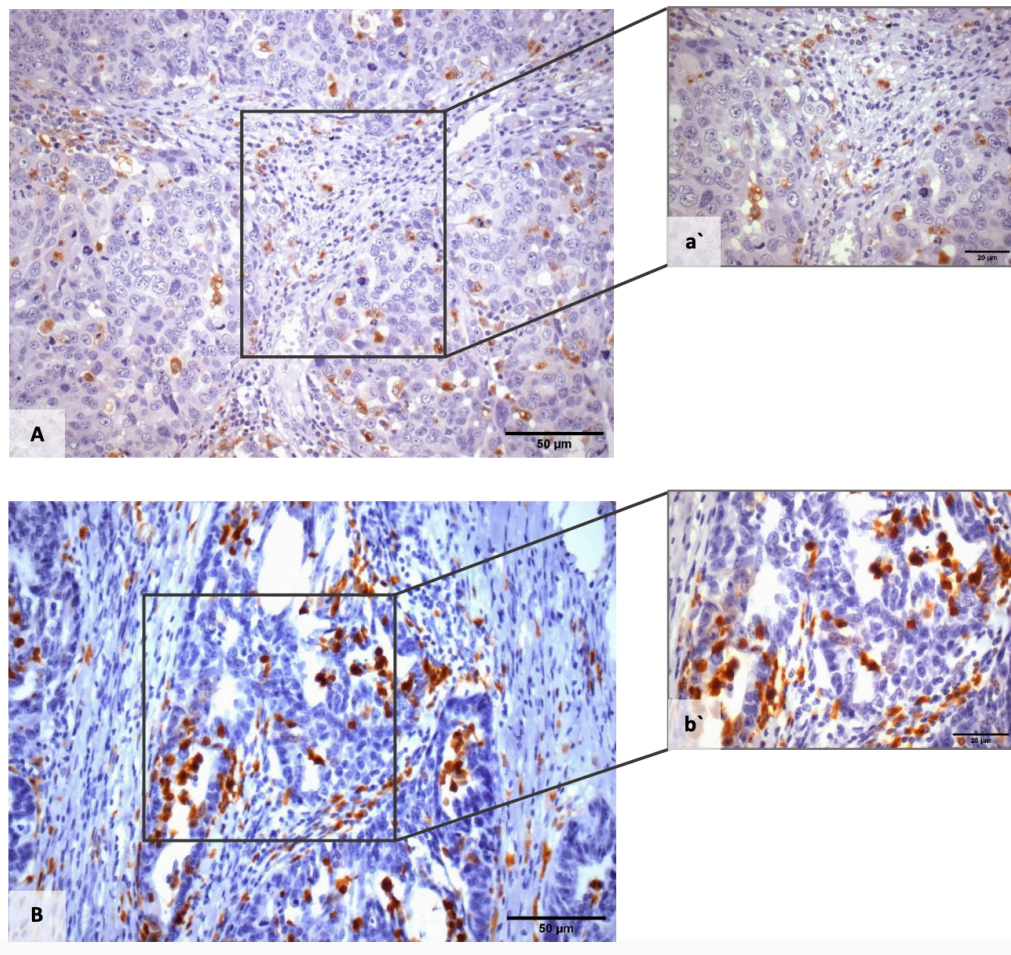
Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos, considerando $p < 0,05$. Paciente em óbito (n= 10), pacientes não óbito (n=14).

Fonte: criado pelo próprio autor.

A Figura 14 representa a quantificação dos macrófagos associados ao tumor (TAM) imunomarcados para CD68+ (Figura 14A) e L1/MAC387+ (Figura 14B) em amostras de câncer de ovário seroso de alto grau (HGSC) em pacientes sensíveis ao tratamento com

platina. Na análise morfométrica da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos da resposta imunológica das pacientes observa-se um aumento da expressão dos marcadores de macrófagos CD68+ (Figura 14C) naquelas pacientes consideradas sensíveis à platina. Já para macrófagos L1/MAC387+ (Figura 14D), as pacientes consideradas resistentes à platina foram as que mais expressaram o marcador. Contudo, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

Figura 13. Imagem representativa da quantificação dos macrófagos associados ao tumor (TAM) imunomarcados para CD68+ e MAC387+ em amostras de câncer de ovário seroso de alto grau (HGSC) em pacientes sensíveis ao tratamento com platina.

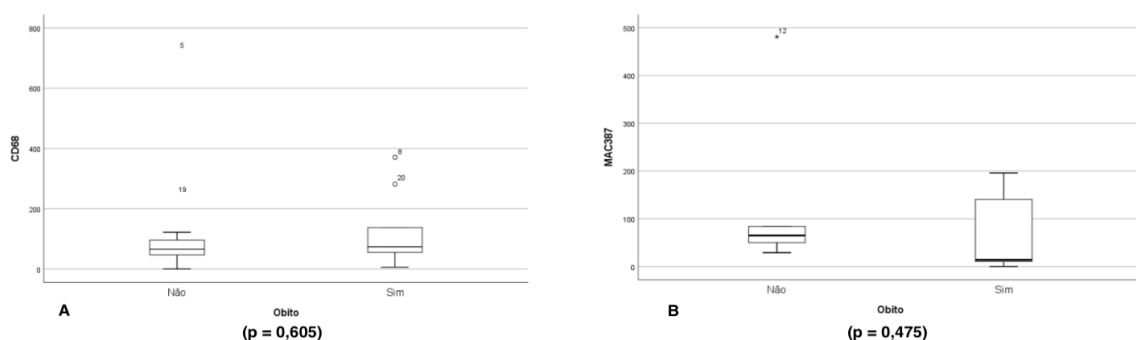


A) Imunoexpressão de TAM CD68+. Em detalhe (a') observar infiltração intratumoral e estromal. (A - escala barra: 50 μ m, ampliação, \times 200; a' - escala barra: 25 μ m, ampliação, \times 400). B) Imunoexpressão de TAM MAC387+. Em detalhe (b') observar infiltração intratumoral e estromal. (B - escala barra: 50 μ m, ampliação, \times 200; b' - escala barra: 25 μ m, ampliação, \times 400). C) Análise morfométrica de TAM CD68+ em pacientes sensíveis e resistentes à platina. D) Análise morfométrica de TAM L1/MAC387+ em pacientes sensíveis e resistentes à platina. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos, considerando $p < 0,05$. Paciente sensível à platina (n= 17), paciente resistente a platina (n=07).

Fonte: criado pelo próprio autor

Os mesmos marcadores foram correlacionados com a ocorrência de óbito e os resultados estão representados na Figura 15. Neste caso, apesar de haver uma maior heterogeneidade no grupo de pacientes que sobreviveram, observou-se uma mediana bastante similar entre os grupos óbito versus não óbito, para o marcador imuno-histoquímico CD68+ (figura 15A). Enquanto que, para L1/MAC387+, o grupo óbito expressou esse marcador de forma bem mais intensa, porém com uma mediana próxima de zero (Figura 15B). Entretanto, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

Figura 14. Análise morfométrica de macrófagos CD68+ e L1/MAC387+ em relação a óbito.



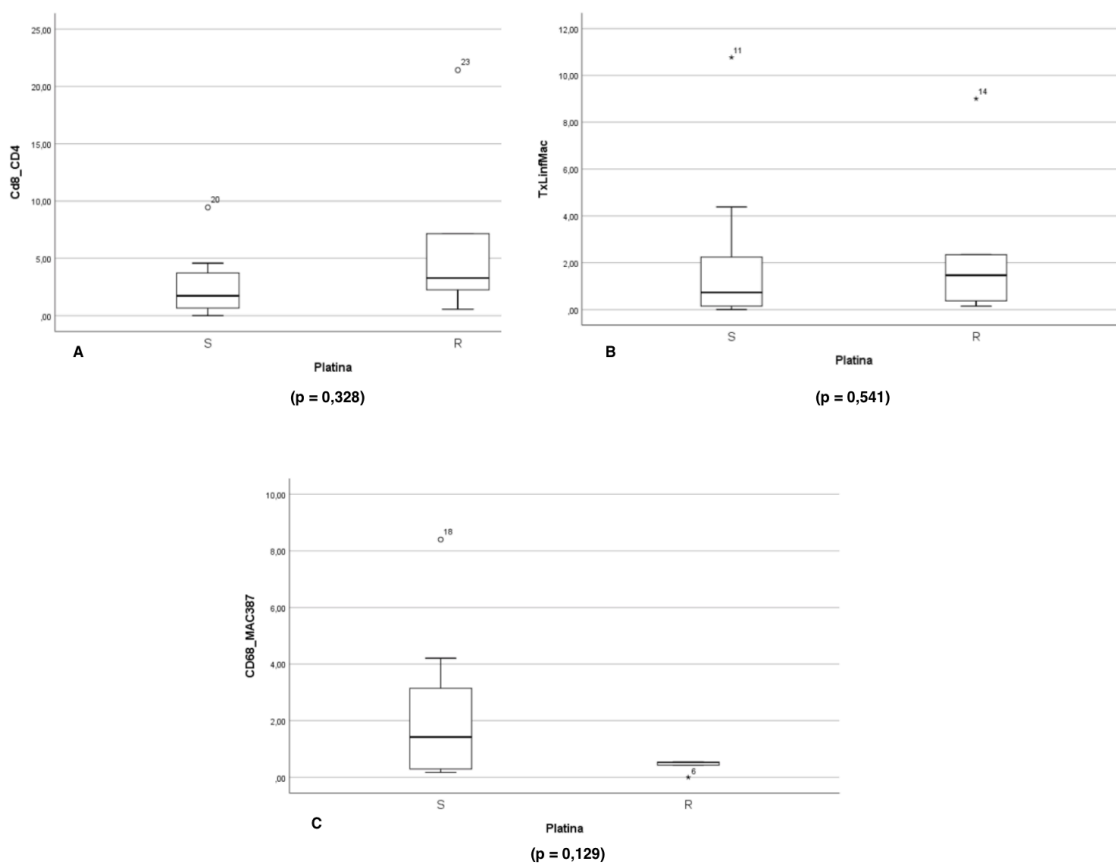
Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos, considerando $p < 0,05$. Paciente em óbito (n= 10), pacientes não óbito (n=14).

Fonte: criado pelo próprio autor.

Além dos marcadores imuno-histoquímicos isoladamente, analisou-se a associação entre a razão de expressão dos marcadores TCD8+/TCD4+ (efetor/regulador),

TCD8+/CD68+ (linfócito/macrófago) e CD68+/L1/MAC387+ (M0/M1) com cada um dos desfechos estudados. A Figura 16 ilustra os resultados obtidos dessa associação com o padrão de resposta à platina. As pacientes consideradas resistentes à platina parecem apresentar valores mais altos para a razão CD8+/CD4+ quando comparadas ao grupo de pacientes platino sensíveis (Figura 16A). Em contrapartida, para a razão CD8+/CD68+, a distribuição foi bastante homogênea entre os dois grupos, apesar de identificar-se uma mediana mais alta no grupo platino resistente (Figura 16B). Para a relação CD68+/L1/MAC387+ há uma grande disparidade entre as razões obtidas para os dois grupos, de tal maneira que, para as consideradas resistentes à platina, a variação é quase imperceptível (Figura 16C). Ainda assim, todas as relações apresentam valor de $p > 0,05$.

Figura 15. Associação entre (A) TCD8+/TCD4+ (efetor/regulador), (B) TCD8+/CD68+ (linfócito/macrófago) e (C) CD68+/L1/MAC387+ (M0/M1), com perfil de sensibilidade à platina.

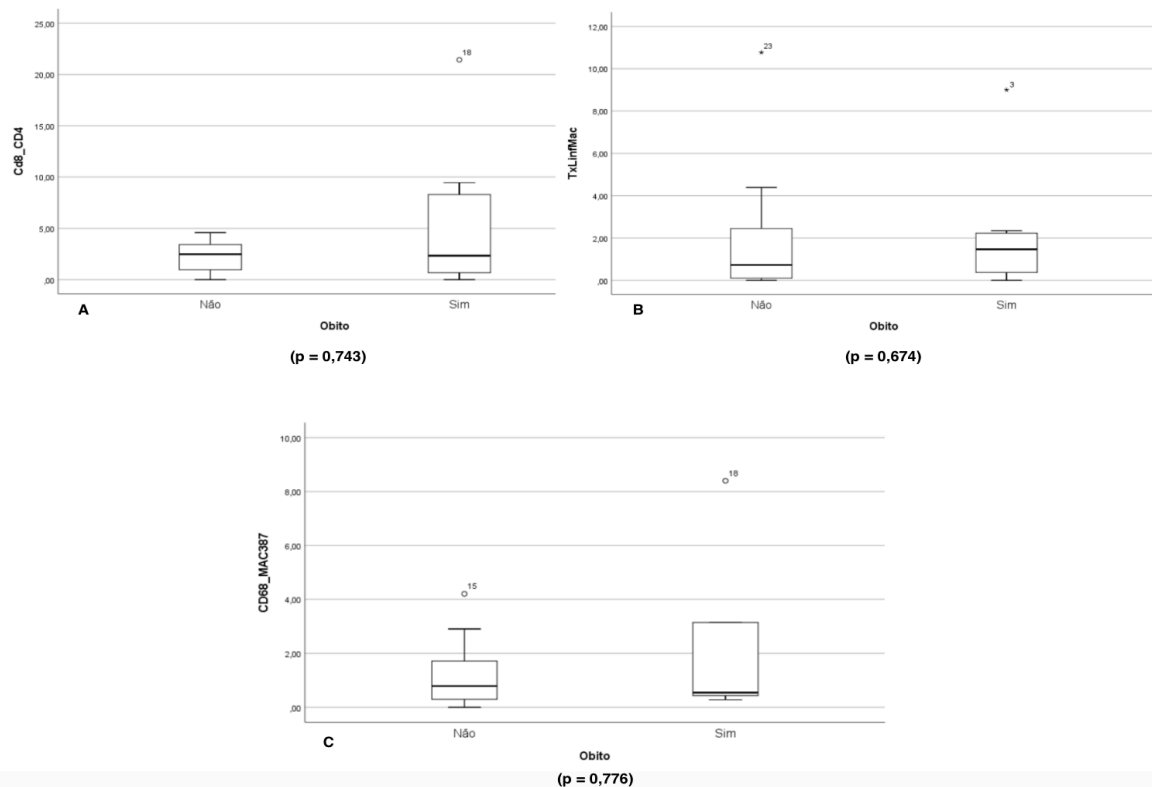


Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos, considerando $p < 0,05$.

Fonte: criado pelo próprio autor.

Na figura 17, por sua vez, registrou-se os resultados obtidos ao analisar a associação entre a razão de expressão dos marcadores TCD8+/TCD4+ (efetor/regulador), TCD8+/CD68+ (linfócito/macrófago) e CD68+/L1/MAC387+ (M0/M1) e a ocorrência de óbito comparando com o grupo de pacientes que sobreviveram. As pacientes do grupo óbito, tendem a expressar mais TCD8+ em relação a TCD4+, observado pelos valores mais altos para a razão entre os dois marcadores neste grupo (Figura 17A). Para a razão CD8+/CD68+, o grupo não óbito apresenta distribuição mais heterogênea, como mostra a Figura 17B. A razão entre CD68+/L1/MAC387+, por sua vez, tende a ser maior no grupo de pacientes que morreram, podendo sugerir, de forma indireta, uma maior expressão de macrófagos M2 neste grupo (Figura 17C). Não se identifica diferença estatística entre os grupos.

Figura 16. Associação entre TCD8+/TCD4+ (efetor/regulador), TCD8+/CD68+ (linfócito/macrófago) e CD68+/L1/MAC387+ (M0/M1), com ocorrência de óbito.



Fonte: criado pelo próprio autor.

Em relação à citorredução, nenhuma análise revelou dados estatisticamente significativos para os marcadores imuno-histoquímicos, porém, observa-se que linfócitos

TCD4+ tiveram baixa expressão no grupo de ressecção subótima, diferente dos outros três marcadores, cuja presença neste grupo foi mais expressiva.

Tabela 4. Comparação dos valores (mediana e quartis) dos marcadores e citorredução. O (citorredução ótima) e SO (citorredução Subótima)

		CD4	CD8	CD68	MAC387
Citorredução	O	60 (23 - 133,5)	56 (24,8 - 239)	64 (35 - 109)	56 (39,5 - 113)
	OS	14,5 (0 - 36)	75 (11 - 147,8)	73,5 (53,5 - 123,8)	74 (11 - 133)
	valor p*	0,13	0,999	0,66	0,999

Legenda: *Teste de Mann Whitney

Fonte: criado pelo próprio autor

5.3 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES *IMMUNE CHECKPOINTS* PD-L1 E PD-L2

O Perfil de expressão de PD-L1 e PD-L2 foi obtido por meio de avaliação semi-quantitativa baseada em scores. Observou-se um perfil diferenciado entre os grupos sensíveis e resistentes tanto para PD-L1 quanto para PD-L2. A expressão de PD-L1 foi mais homogênea no grupo S (sensível) à platina, enquanto o grupo de pacientes R (resistentes) teve predomínio da expressão discreta (57,1%) (Tabela 4). Para PD-L2 o percentual de expressão foi mais discreto no grupo S (sensível) e mais intenso no grupo R (resistente). Além disso, a comparação entre esses perfis e a resposta das pacientes à platina revelou que não houve associação entre o perfil de susceptibilidade ao tratamento à base de platina e PD-L1 ($p = 0,240$). No entanto, essa associação com PD-L2 mostrou-se estatisticamente significativa ($p = 0,020$).

Tabela 5. Correlação de biomarcadores PDL1 e PDL2 com sensibilidade à platina

PDL1	Platina		valor p*
	S (n = 17)	R (n = 7)	
Negativo	11,8%	14,3%	0,240
Discreto	29,4%	57,1%	
Moderado	41,2%	0%	
Intenso	17,6%	28,6%	
PDL2			
Negativo	5,9%	28,6%	0,020
Discreto	41,2%	0%	
Moderado	52,9%	42,9%	
Intenso	0%	28,6%	
*Teste Qui Quadrado			

Fonte: criado pelo próprio autor.

Quando avalia-se a associação de PD-L1 e PD-L2 com a ocorrência de óbito, os padrões moderado e intenso de expressão de PD-L2, especialmente o primeiro (71,4%), se destacam para o grupo óbito, enquanto para o grupo não óbito, mais de 50% das expressões se concentram nos padrões negativo ou discreto. Já para PD-L1, os padrões de expressão assumem uma distribuição mais homogênea para ambos os grupos, com um pequeno predomínio do padrão discreto para o grupo não óbito. Não houve, porém, significância estatística para os dados apresentados.

Tabela 6. Correlação de biomarcadores PD-L1 e PD-L2, com óbito

PDL1	Óbito		valor p*
	Não (n = 17)	Sim (n = 07)	
Negativo	5,9%	28,6%	0,290
Discreto	47,1%	14,3%	
Moderado	29,4%	28,6%	
Intenso	17,6%	28,6%	
PDL2			
Negativo	17,6%	0%	0,346
Discreto	35,3%	14,3%	
Moderado	41,2%	71,4%	
Intenso	5,9%	14,3%	
*Teste Qui Quadrado			

Fonte: criado pelo próprio autor

A associação entre as proteínas PD-L1 e PD-L2 com citorredução está representada na Tabela 7. Pode-se perceber, semelhante ao que ocorre em relação a óbito, que o padrão moderado de expressão de PD-L2 se destaca claramente no grupo de citorredução subótima (62,5%), enquanto no grupo de citorredução ótima, PD-L2 foi expressa com padrão discreto em 66,7% dos casos. A distribuição dos padrões de expressão de PD-L1, no entanto, não parece assumir uma diferença expressiva entre os grupos. Passa essa análise, mantém-se $P > 0,05$.

Tabela 7. correlação de biomarcadores PD-L1 e PD-L2 com citorredução ótima (O) e subótima (SO)

		Citorredução		valor p*
		O	SO	
PDL1	Negativo	0%	18,8%	0,645
	Discreto	33,3%	37,5%	
	Moderado	33,3%	25,0%	
	Intenso	33,3%	18,8%	
		O	SO	valor p
PDL2	Negativo	0%	12,5%	0,100
	Discreto	66,7%	18,8%	
	Moderado	16,7%	62,5%	
	Intenso	16,7%	6,3%	

Legenda: *Teste Qui Quadrado

Fonte: criado pelo próprio autor

6. DISCUSSÃO

O carcinoma ovariano seroso de alto grau é caracterizado por sua agressividade, alta taxa de recorrência, metástase e quimiorresistência significativa¹⁰. 55% dos pacientes com carcinoma epitelial de ovário apresentam resposta imune anti tumoral espontânea, motivo pelo qual esse tipo de tumor pode ser considerado imunogênico². As células imunes e as moléculas imunorreguladoras presentes no TME estão envolvidas tanto nas respostas imunes antitumorais do hospedeiro quanto nos mecanismos imunossupressores que promovem a progressão do câncer^{22,26}. Linfócitos e macrófagos estão entre os principais fatores envolvidos na interação entre o sistema imunológico e as células cancerosas¹⁰.

Em 2017, Fiona e colaboradores publicaram que níveis aumentados de linfócitos intra-tumorais e estromais estariam associados a um melhor prognóstico no carcinoma ovariano. No entanto, isso seria apenas estatisticamente significativo para linfócitos intra-tumorais^{2,18,32}. Em 2020, Hao e colaboradores, publicaram uma revisão sistemática e meta-análise mostrando o impacto dos TILs no prognóstico das pacientes com carcinoma seroso de alto grau. Os autores evidenciaram, neste estudo, que níveis elevados de TILs TCD3+, TCD4+, TCD8+ e CD103+ estariam positivamente associados à melhor sobrevida global ou livre de progressão de doença para essas pacientes³³.

Os dados apresentados em nosso estudo, mostraram que, apesar de não ter sido observada significância estatística, foi possível identificar um aumento da expressão de linfócitos TCD8+ e TCD4+ em pacientes consideradas sensíveis à quimioterapia padrão baseada em platina. Especialmente para os linfócitos TCD4+, houve uma considerável diferença entre a expressão deste marcador para o grupo platino-sensível em relação àquelas platino-resistentes. Considerando que pacientes platino-sensíveis apresentam melhor prognóstico, os dados obtidos corroboram os dados demonstrados na literatura³³.

O grupo de pacientes que evoluíram para óbito bem com o que foi submetido a ressecção subótima apresentou menor expressão de linfócitos TCD4+, o que também permite associar este marcador a um prognóstico mais favorável. No entanto, Zitvogel e colaboradores (2006), afirmaram que em carcinomas ovarianos ou nos melanomas, a presença de células T reguladoras (TReg), como o TCD4+, seria um preditor de redução de sobrevida³⁴. Em nossa casuística, observamos uma tendência inversa, em que a maior expressão de TCD4+ foi observada nos grupos de melhor prognóstico, evidenciada na razão TCD8+/TCD4+.

Apesar da infiltração de células TCD8+ no tumor ser um símbolo de reconhecimento imunológico e poder prever melhor sobrevida para pacientes com câncer de ovário, em um microambiente imunossupressor que é comum na maioria dos casos, as células TCD8+ muitas vezes tornam-se disfuncionais³⁵. É possível que este seja um evento que tenha interferido nos resultados das análises da nossa amostra, uma vez que a expressão de linfócitos TCD4+ (Treg) pode ter interferido na função citotóxica de linfócitos TCD8+. Isso fica claro quando analisamos a razão TCD8+/TCD4+, onde grupos com expressão proporcionalmente maior de linfócitos TCD8+ foram grupos provavelmente associados a prognóstico mais reservado. Não encontramos diferença na expressão de TCD8+ para o grupo óbito quando comparado ao grupo não óbito. Apenas uma expressão discretamente maior de linfócitos TCD8+ para as pacientes submetidas a ressecção subótima.

Não foi observada neste estudo, significância estatística para os macrófagos (CD68+) e seu subtipo M1 (L1/MAC387+). Contudo a maior expressão de CD68+ foi observada no grupo de pacientes platino-sensíveis e de L1/MAC387+, no grupo resistente à platina. A associação de CD68+ isolado com prognóstico em pacientes com carcinoma ovariano é controversa. Yuan e colaboradores (2017) afirmam que macrófagos associados ao tumor (TAMs) marcados com CD68+, isoladamente, não teriam relação com o prognóstico no câncer de ovário²⁷. Outro estudo mais recente, realizado nesse sentido, também não confirmou a associação entre CD68+ isolado e prognóstico de carcinoma ovariano²⁶.

Para a relação entre os subtipos de macrófagos, M1/M2 nos tecidos tumorais, vários estudos sugerem haver uma associação positiva com sobrevida mais favorável quando a proporção M1/M2 é maior^{10,18,36}. A comparação de CD68+/L1/MAC387+, que representa a razão M0/M1, em relação a alguns desfechos, como óbito, foi considerada nesse estudo. Observou-se uma tendência de maiores valores de expressão desta relação no grupo que evoluiu para óbito, permitindo inferir a possibilidade de menor quantidade de macrófagos M1 em relação a M2, já que M0 representaria o somatório dos dois fenótipos (M1 + M2). Isso também fica perceptível na análise isolada de L1/MAC387+ (M1), em que a expressão deste marcador tende a ser menor no grupo óbito.

Esses resultados são compatíveis com o que foi descrito por Jantti e colaboradores (2017). Esses autores descreveram a alta relação de macrófagos M1/M2 nos tecidos tumorais com melhor prognóstico no carcinoma ovariano seroso de alto grau. Além disso, descrevem que a maior densidade de macrófagos CD163+ (M2) e razão de macrófagos CD163+/CD68+ estão associadas a pior sobrevida livre de progressão²⁶.

Finalmente, em nosso estudo também foi avaliada a resistência à platina e a expressão de PD-L1 e PD-L2 tendo-se demonstrado associação estatisticamente significativa com PD-L2. Contudo, não se evidenciou associação estatisticamente significativa quando estes marcadores foram associados ao óbito, apesar da diferença dos padrões de expressão desse marcador entre os grupos óbito e não-óbito. Observou-se que os padrões de expressão de PD-L2 negativo ou discreto prevalecem no grupo não óbito enquanto os padrões moderado e intenso se sobressaem no grupo óbito.

Em alguns estudos, avaliando a associação da expressão de PD-L1 e prognóstico, não se tem um consenso claramente demonstrado, de forma que a expressão de PD-L1 tanto pode estar associada à redução da sobrevida em pacientes com carcinomas de células de esôfago, gástrico, pancreático e de células renais, como a uma melhor sobrevida, em pacientes com

carcinomas de células de Merkel, mama e cervical. Também existem relatos conflitantes sobre seu significado dentro do mesmo tipo de tumor em pacientes com melanoma. Segundo Wang e colaboradores (2017), a falta de expressão de PD-L1 tumoral em combinação com maior pontuação de CD8 + TILs intraepitelial prediz melhor sobrevida em pacientes com carcinoma ovariano seroso de alto grau. Possivelmente uma amostra com maior número de pacientes talvez pudesse elucidar alguma diferença estatisticamente significativa de PD-L1 em nosso estudo³⁷.

Na literatura, existem muitas publicações em relação a PD-L1, associadas a prognóstico em vários tipos de câncer, inclusive no câncer de ovário^{21,38,39}. No entanto, para PD-L2 a literatura ainda é escassa. Wertel, et al (2020), demonstraram que a expressão de PD-L2+ no fluido peritoneal estaria associada à melhor sobrevida global em pacientes com câncer de ovário⁴⁰. A análise dos dados de nosso estudo, entretanto, diverge dos resultados apresentados por esses autores. Evidenciou que, além da associação positiva de PD-L2+ com paciente platino-resistentes, ($p = 0,020$), há um predomínio da expressão dessa proteína no grupo de citorredução sub-ótima e no grupo óbito, mostrando que a maior expressão de PD-L2 no microambiente tumoral estaria mais associada a pior prognóstico. Esse é um dado interessante que pode ser mais bem explorado, já que existem poucas publicações sobre o papel específico de PD-L2 nesses tumores.

Observando-se que a expressão dos ligantes de PD-1 (PD-L1 ou PD-L2) leva à regulação negativa da atividade das células T e que as células TCD8+, que funcionam com células T citotóxicas, podem ter sua função prejudicada na presença dessas proteínas, é possível inferir que a associação da expressão de PD-L2 com prognóstico mais reservado, como encontrado em nosso estudo, seja um evento provável.

Este estudo abre a perspectiva para a possibilidade de ampliar a investigação sobre o efeito prognóstico de PD-L2 sozinho ou em associação com outros marcadores, a fim de comprovar os resultados obtidos, em uma coorte maior e idealmente em estudo prospectivo. Uma fragilidade dos estudos retrospectivos é o fato de, não raro, identificarem-se inconsistências em prontuário médico e variedade de qualidade de amostra, que podem ocorrer de acordo com armazenamento, especialmente se muito antigas ou mesmo condições da coleta inadequadas de espécime cirúrgico.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados em nosso estudo, pode-se concluir que:

Este estudo se caracterizou pela prevalência dos casos de câncer de ovário entre a quinta e sexta décadas de vida, sendo o carcinoma seroso de alto grau o único tipo histológico avaliado. Para a maioria das pacientes o diagnóstico foi feito em fase avançada da doença. Em sua maioria, a análise histológica identificou presença de invasão linfo-vascular e a ressecção ótima não foi possível. Mais de 50% das pacientes eram platino-sensíveis, porém com alto índice de recorrência. Os óbitos ocorreram com menos de 3 anos de evolução da doença em quase 60% dos casos.

A análise da expressão dos marcadores imunológicos CD8+, CD4+, CD68+ e L1/MAC387+, no microambiente tumoral, não evidenciou diferenças estatísticas em relação ao prognóstico das pacientes, apesar de identificar-se uma maior expressão desses marcadores em pacientes platino-sensíveis e menor expressão no grupo óbito e de citorredução ótima.

A expressão mais pronunciada de CD4+ pode ter interferido com a função dos linfócitos T citotóxicos (CD8+). Enquanto para os macrófagos (CD68+ e MAC387+), parece haver uma relação de M2 com piores desfechos clínicos. A expressão dos inibidores de *immuno checkpoints* PD-L1 e PD-L2 evidenciou associação significativamente positiva para PD-L2 com o grupo de pacientes platino-resistentes, sugerindo sua relação com pior prognóstico, porém, PD-L2 é uma proteína de ligação de PD1 ainda menos estudada.

Finalmente, cabe ressaltar que, a ambiguidade observada nos dados encontrados no presente estudo, corrobora com o fato de os tumores ovarianos corresponderem a uma doença muito heterogênea. Associado a essa heterogeneidade, o pequeno número de casos avaliados interfere de forma negativa no que se refere à obtenção de dados com relevância estatística. Estudos prospectivos, multicêntricos e com maior número de casos, com análise de biomarcadores variados, isolados ou em associação, são necessários para auxiliar a definição de um potencial marcador que seja capaz de prever prognóstico das pacientes com câncer de ovário, de forma robusta, e auxiliar o desenvolvimento de terapias alvo que possam impactar no controle e sobrevida dessas pacientes.

8. REFERÊNCIAS

1. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 22;20(4):952.
2. Salas-Benito D, Vercher E, Conde E, Glez-Vaz J, Tamayo I, Hervas-Stubbs S. Inflammation and immunity in ovarian cancer. *EJC Suppl*. 2020 Aug 22;15:56-66. doi: 10.1016/j.ejcsup.2019.12.002.
3. Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):433-43. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79.
4. Santandrea G, Piana S, Valli R, Zanelli M, Gasparini E, De Leo A, et al. Immunohistochemical Biomarkers as a Surrogate of Molecular Analysis in Ovarian Carcinomas: A Review of the Literature. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jan 29;11(2):199. doi: 10.3390/diagnostics11020199.
5. Färkkilä A, Gulhan DC, Casado J, Jacobson CA, Nguyen H, Kochupurakkal B, et al. Author Correction: Immunogenomic profiling determines responses to combined PARP and PD-1 inhibition in ovarian cancer. *Nat Commun*. 2020 May 18;11(1):2543. doi: 10.1038/s41467-020-16344-z. Erratum for: *Nat Commun*. 2020 Mar 19;11(1):1459.
6. INCA. Estimativa de Câncer no Brasil (2020): Câncer de Ovário. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Available on: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>>. Last accessed on: 08 Ago 2022.
7. INCA. Atlas On-line de Mortalidade. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Available on: <<https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo05/consultar.xhtml#panelResultado>>. Last accessed on: 08 Ago 2022.
8. Ramalingam P. Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2016 Feb;30(2):166-76.
9. Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):433-43. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79.

10. Nowak M, Klink M. The Role of Tumor-Associated Macrophages in the Progression and Chemoresistance of Ovarian Cancer. *Cells*. 2020 May 22;9(5):1299. doi: 10.3390/cells9051299.
11. Rankin EB. Genomics and molecular mechanisms of high grade serous ovarian cancer: the 12th Biennial Rivkin Center Ovarian Cancer Research Symposium. *Int J Gynecol Cancer*. 2019 Aug;29(2):7-11. doi: 10.1136/ijgc-2019-000490.
12. NIH. Tumor microenvironment. NCI Dictionaries. National Cancer Institute (NCI). Available on: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-microenvironment>>. Last accessed on: 08 Ago 2022.
13. Figueiredo CRLV. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: an update. *J Bras Patol Med Lab*. 2019 May-Jun;55(3): doi: 10.5935/1676-2444.20190029.
14. Weber CE; Kuo PC. The tumor microenvironment. *Surg Oncol*. 2012;21:172-177.
15. Naing A; Hajar J. Immunotherapy: Third Edition. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer. Volume 1244. ISBN 2214-8019 (electronic). Doi: 10.1007/978-3-030-41008-7.
16. Yang Z, Gu JH, Guo CS, Li XH, Yang WC. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio is a predictor of survival of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Oncotarget*. 2017 Jul 11;8(28):46414-46424. doi: 10.18632/oncotarget.16793.
17. Santoiemma PP, Powell DJ Jr. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(6):807-20. doi: 10.1080/15384047.2015.1040960.
18. Gao Y, Chen L, Cai G, Xiong X, Wu Y, Ma D, et al. Heterogeneity of immune microenvironment in ovarian cancer and its clinical significance: a retrospective study. *Oncoimmunology*. 2020 Apr 30;9(1):1760067. doi: 10.1080/2162402X.2020.1760067.
19. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252-64. doi: 10.1038/nrc3239.
20. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803. PMID: 15032581.
21. Alard E, Butnariu AB, Grillo M, Kirkham C, Zinovkin DA, Newnham L, Macciochi J, Pranjol MZI. *Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint*

- Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 7;12(7):1826. doi: 10.3390/cancers12071826.
22. Turner TB, Buchsbaum DJ, Straughn JM Jr, Randall TD, Arend RC. Ovarian cancer and the immune system - The role of targeted therapies. *Gynecol Oncol*. 2016 Aug;142(2):349-56. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.05.007.
 23. Shalpour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3347-55. doi: 10.1172/JCI80007.
 24. Mumm JB, Oft M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. *Oncogene*. 2008 Oct 6;27(45):5913-9. doi: 10.1038/onc.2008.275.
 25. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec; 420.
 26. Jääntti T, Luhtala S, Mäenpää J, Staff S. Characterization of immunoreactivity with whole-slide imaging and digital analysis in high-grade serous ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2020 Nov;42(11):1010428320971404. doi: 10.1177/1010428320971404.
 27. 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 Feb;124(2):192-8. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.09.039.
 28. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*. 2021 Mar 5;12(9):2735-2746. doi: 10.7150/jca.57334. PMID: 33854633; PMCID: PMC8040720.
 29. Yang H, Yao Z, Zhou X, Zhang W, Zhang X, Zhang F. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors: Insights into immunological dysregulation. *Clin Immunol*. 2020 Apr;213:108377. doi: 10.1016/j.clim.2020.108377.
 30. Gelsomino L, Naimo GD, Malivindi R, Augimeri G, Panza S, Giordano C, et al. Knockdown of Leptin Receptor Affects Macrophage Phenotype in the Tumor Microenvironment Inhibiting Breast Cancer Growth and Progression. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 27;12(8):2078. doi: 10.3390/cancers12082078.
 31. Panza S, Gelsomino L, Malivindi R, Rago V, Barone I, Giordano C, et al. Leptin Receptor as a Potential Target to Inhibit Human Testicular Seminoma Growth. *Am J Pathol*. 2019 Mar;189(3):687-698. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.11.012.
 32. James FR, Jiminez-Linan M, Alsop J, Mack M, Song H, Brenton JD, Pharoah PDP, Ali HR. Association between tumour infiltrating lymphocytes, histotype and clinical

- outcome in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2017 Sep 20;17(1):657. doi: 10.1186/s12885-017-3585-x.
33. Hao J, Yu H, Zhang T, An R, Xue Y. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Med Oncol*. 2020 Oct 31;12:1758835920967241. doi: 10.1177/1758835920967241.
34. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):715-27. doi: 10.1038/nri1936.
35. Jiang Y, Wang C, Zhou S. Targeting tumor microenvironment in ovarian cancer: Premise and promise. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020 Apr;1873(2):188361. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188361.
36. Li N, Li B, Zhan X. Comprehensive Analysis of Tumor Microenvironment Identified Prognostic Immune-Related Gene Signature in Ovarian Cancer. *Front Genet*. 2021 Feb 10;12:616073. doi: 10.3389/fgene.2021.616073.
37. Wang Q, Lou W, Di W, Wu X. Prognostic value of tumor PD-L1 expression combined with CD8+ tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer. *Int Immunopharmacol*. 2017 Nov;52:7-14. doi: 10.1016/j.intimp.2017.08.017.
38. Zhu J, Yan L, Wang Q. Efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors in ovarian cancer: a single-arm meta-analysis. *J Ovarian Res*. 2021 Aug 28;14(1):112. doi: 10.1186/s13048-021-00862-5.
39. Wang L. Prognostic effect of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in ovarian cancer: a systematic review, meta-analysis and bioinformatics study. *J Ovarian Res*. 2019 Apr 30;12(1):37. doi: 10.1186/s13048-019-0512-6.
40. Wertel I, Suszczyk D, Pawłowska A, Bilska M, Chudzik A, Skiba W, et al. Prognostic and Clinical Value of Interleukin 6 and CD45+CD14+ Inflammatory Cells with PD-L1+/PD-L2+ Expression in Patients with Different Manifestation of Ovarian Cancer. *J Immunol Res*. 2020 Sep 30;2020:1715064. doi: 10.1155/2020/1715064.