

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**JULIANA ALVES JOSAHKIAN**

Avaliação da influência da expressão de *STAT1* na resposta ao tratamento quimioterápico no  
câncer de ovário seroso de alto grau

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2016**

**JULIANA ALVES JOSAHKIAN**

Avaliação da influência da expressão de *STAT1* na resposta ao tratamento quimioterápico no  
câncer de ovário seroso de alto grau

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre pelo curso de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Josahkian, Juliana Alves

Avaliação da influência da expressão de *STAT1* na resposta ao tratamento quimioterápico no câncer de ovário seroso de alto grau. Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

65p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.

Orientador: Squire, Jeremy Andrew.

1. Câncer de ovário; 2. *STAT1*; 3. Microambiente; 4. Resposta ao tratamento; 5. Inflamação; 6. Citocinas; 7. Microarranjo de tecidos

Nome: JOSAHKIAN, Juliana Alves

Título: Avaliação da influência da expressão de *STAT1* na resposta ao tratamento quimioterápico no câncer de ovário seroso de alto grau

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Ofereço meu sincero reconhecimento a todas as pessoas que contribuíram para este trabalho. Em especial, agradeço:

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire, pela orientação. Thank you for your expertise and for the example of integrity and dedication to work. I felt truly fortunate to work under your guidance.

À Profa. Dra. Lucia Martelli, pela oportunidade.

À Dra. Madhuri Koti, por dividir um pouco do seu conhecimento.

Ao Dr. Henrique Torres Ventura, por oferecer significativa ajuda com a análise estatística ( $P$  muito menor que 0,05) e por estar sempre disposto a explicar mil vezes.

À Dra. Virgínia Maria Cóser, pela leitura cuidadosa da dissertação.

Ao setor de Mastologia e Oncologia Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à Dra. Christiâni Bisinoto de Sousa.

Aos membros da banca examinadora.

Aos colegas, professores e funcionários da pós-graduação. Sobretudo, meus agradecimentos aos amigos do “Bloco C” pelo companheirismo e auxílio a qualquer hora. Em especial ao Silvio Avelino dos Santos, por me guiar pelo laboratório; à Tatiana Mozer Joaquim, pela enorme paciência e pelo cuidado em todos os detalhes; ao Thiago Vidotto, por todas as sugestões e pela valiosa troca de ideias e ao Carlos Henrique Paiva Grangeiro, por me ensinar tanto.

Aos docentes, médicos assistentes, residentes e funcionários do Setor de Genética Médica e do Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio durante esse tempo. Em especial à enfermeira Fátima das Graças Carvalho, pelo carinho.

Ao Ricardo, por cuidar de mim.

À minha família, as melhores pessoas do mundo: meus pais, Márcia e Luiz, e meu irmão, Fernando. Por todo amor, carinho, amizade e apoio.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está  
esperando para ser conhecida.”

Carl Sagan

## RESUMO

JULIANA, J. A. Avaliação da influência da expressão de *STAT1* na resposta ao tratamento quimioterápico no câncer de ovário seroso de alto grau. 2016. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

O câncer de ovário é uma importante causa de mortalidade. O subtipo seroso de alto grau é o mais frequente e caracteriza-se por comportamento agressivo, com crescimento rápido e metástase precoce. A falta de ferramentas para diagnóstico em estádios iniciais e a insuficiência de resposta à quimioterapia convencional são dois principais obstáculos para o manejo do câncer seroso de ovário. A detecção precoce neste tumor é complicada por sintomas inespecíficos e ausência de biomarcadores confiáveis. Além disso, o desenvolvimento de resistência à quimioterapia é um desafio para o tratamento, que é geralmente baseado na combinação de platina e paclitaxel. A influência do microambiente tumoral na resposta terapêutica ainda é pouco conhecida. No entanto, há evidências crescentes de que a resposta imunológica pré-existente pode estar relacionada com a variação da sensibilidade à quimioterapia. O microambiente imunorreativo foi associado à melhor prognóstico no câncer do ovário seroso de alto grau em recente estudo canadense. Proteínas da família de Transdutores de Sinal e Ativadores da Transcrição (STATs) participam da regulação de citocinas e são determinantes nas respostas imunes no microambiente tumoral, podendo promover ou inibir o crescimento tumoral. Dados recentes mostram que a expressão elevada de um dos reguladores de STAT, *STAT1* atua na tumorigênese do câncer de ovário, facilitando a resposta imune e, potencialmente, alterando a resposta à quimioterapia. Para avaliar o papel da expressão de *STAT1* como biomarcador preditivo em 65 pacientes brasileiras com câncer seroso de ovário, examinamos os níveis de *STAT1* por imunoistoquímica, e analisamos se houve correlação entre expressão dessa proteína e resposta clínica. Alta expressão de *STAT1* foi significativamente associada maior intervalo livre de doença ( $P=0,0256$ ) e maior sobrevida global ( $P=0,0193$ ). Estes achados da coorte brasileira, com tempo de seguimento maior que cinco anos, confirmam a associação entre alta expressão de *STAT1* e melhor resposta à quimioterapia, e fornecem validação adicional desta proteína como um biomarcador preditivo. Além disso, estes resultados chamam atenção para a possibilidade de utilizar a via de *STAT1* para o desenvolvimento de novos medicamentos imunomoduladores, que poderiam melhorar a resposta ao tratamento.

Palavras-chave: câncer de ovário, *STAT1*, microambiente, resposta ao tratamento, inflamação, citocinas, microarranjo de tecidos



## ABSTRACT

JOSAHKIAN, J. A. Influence of *STAT1* expression in response to chemotherapy in high-grade serous ovarian cancer. 2016, Master's degree in Science, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Ovarian cancer is a major cause of mortality worldwide. The most frequent subtype is high grade serous, which is characterized by aggressive behavior with rapid growth and early metastasis. Lack of early diagnostic tools and failure of response to conventional chemotherapies are two major impediments to serous ovarian cancer management. Early detection in initial stages is complicated by non-specific symptoms and lack of reliable biomarkers. In addition, development of chemotherapy resistance is a challenge for treatment, which is generally based on combination of platinum and paclitaxel. The influence of the microenvironment of the tumor on therapeutic response is still unknown. However, there is increasing evidence that a pre-existing immunological response may be related to variation in chemotherapy sensitivity. The immunoreactive microenvironment has been shown to be associated with better prognosis in high grade serous ovarian cancer in a recent Canadian study. The Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) proteins regulate cytokines and are central in determining whether immune responses in the tumor microenvironment promote or inhibit cancer. Recent data show that high expression of one of the STAT regulators, *STAT1*, operates in ovarian cancer tumorigenesis, facilitating immune response and potentially altering response to chemotherapy. To evaluate the role of *STAT1* expression as a predictive biomarker in 65 Brazilian serous ovarian cancer patients, we examined *STAT1* levels by immunohistochemistry to determine if there was correlation between expression of this protein and clinical response. High expression of *STAT1* was significantly associated with both improved disease-free survival ( $P=0,0256$ ) and overall survival ( $P=0,0193$ ). These findings from a Brazilian cohort after more than five years of follow up confirm the association of high *STAT1* expression with better response to chemotherapy, and provide additional validation of this protein as a predictive biomarker. Moreover these results draw attention to the possibility of utilizing the *STAT1* pathway for the development new immunomodulator drugs, that could enhance response to treatment.

Keywords: ovarian cancer, *STAT1*, microenvironment, drug response, inflammation, cytokines, tissue microarray

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Os três Es da imunoeedição do câncer.....   | 16 |
| Figura 2. Modelos propostos para recorrência sensível e resistente à platina.....   | 17 |
| Figura 3. Comparação dos níveis de expressão de genes inflamatórios em tumores de ovário serosos de alto grau entre pacientes sensíveis e resistentes à quimioterapia.....  | 20 |
| Figura 4. Funções de supressão tumoral de STAT1.....  | 22 |
| Figura 5. Escores para análise por imunistoquímica da expressão de <i>STAT1</i> em microarranjo tecidual .....  | 30 |
| Figura 6. Fluxograma de seleção das pacientes para estudo da influência de <i>STAT1</i> na resposta a quimioterapia, a partir do resultado da análise da expressão de <i>STAT1</i> pela técnica de imunistoquímica. ....  | 32 |
| Figura 7. Curvas de sobrevivência para Intervalo Livre de Doença (Kaplan-Meier) das 36 pacientes com baixa expressão de <i>STAT1</i> (linha contínua azul) e das 29 pacientes com alta expressão de <i>STAT1</i> (linha tracejada vermelha), (Log-Rank, P=0,0256) ..... | 37 |
| Figura 8. Curvas de sobrevivência para Sobrevida Global (Kaplan Meier) das 36 pacientes com baixa expressão de <i>STAT1</i> (linha contínua azul) e das 29 pacientes com alta expressão de <i>STAT1</i> (linha tracejada vermelha), (Log-Rank, P=0,0193) .....          | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos das 65 pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau selecionadas para análise.....                  | 35 |
| Tabela 2. Correlações de Pearson entre os dados clínicos e histopatológicos e STAT1.....  | 36 |
| Tabela 3. Sobrevivência em função da classe de expressão de <i>STAT1</i> . ....   | 38 |
| Tabela 4. Frequência de dados censurados e não censurados (falharam) por classe de expressão de <i>STAT1</i> para Recorrência e Sobrevida global..... | 39 |
| Tabela 5. Resultados da análise de regressão de risco proporcional de COX para intervalo livre de doença.....   | 39 |
| Tabela 6. Resultados da análise de regressão de risco proporcional de COX para sobrevida global .....   | 40 |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| 2     | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....                                       | 24 |
| 3     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 25 |
| 3.1   | Objetivo Geral.....  | 25 |
| 3.2   | Objetivos Específicos .....                                      | 25 |
| 4     | <b>METODOLOGIA</b> .....   | 26 |
| 4.1   | Casuística .....   | 26 |
| 4.1.1 | Critério de inclusão.....  | 26 |
| 4.1.2 | Critérios de exclusão .....                                      | 26 |
| 4.2   | Material .....   | 27 |
| 4.3   | Métodos .....  | 27 |
| 4.3.1 | Parâmetros clínicos, cirúrgicos e histopatológicos.....          | 27 |
| 4.3.2 | Critério para análise de sobrevivência.....                      | 28 |
| 4.3.3 | Imunoistoquímica .....   | 29 |
| 4.3.4 | Análise de imagens .....   | 29 |
| 4.4   | Seleção dos casos .....  | 30 |
| 4.4.1 | Seleção dos casos a partir da análise imunoistoquímica .....     | 30 |
| 4.4.2 | Seleção dos casos a partir dos dados clínicos e cirúrgicos ..... | 32 |
| 4.5   | Análise estatística .....  | 32 |
| 5     | <b>RESULTADOS</b> .....  | 34 |
| 6     | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 41 |
| 7     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 48 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 49 |
|       | <b>APÊNDICE</b> .....  | 64 |
|       | <b>ANEXO</b> .....   | 65 |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de ovário é, dentre as neoplasias malignas ginecológicas, a segunda causa de morte no mundo (RESCIGNO et al., 2013). No Brasil, foi responsável por 3.283 mortes em 2013 de acordo com dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade, com estimativa de 6.150 novos casos em 2016 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016). Além disso, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de ovário é o quinto tipo de tumor mais incidente na região centro-oeste e o sétimo mais incidente nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Norte (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016).

O carcinoma epitelial de ovário corresponde a aproximadamente 90% de todos os casos, sendo a quarta causa de morte relacionada a neoplasias malignas ginecológicas nos países desenvolvidos (COLOMBO, 2010; JASON et al., 2014; PRAT, 2014). De acordo com análises imunoistoquímicas, moleculares e histopatológicas, aproximadamente 98% dos tumores malignos epiteliais de ovário podem ser classificados em um dos seguintes tipos de carcinoma: seroso de alto grau, seroso de baixo grau, endometrióide, de células claras e mucinoso (PRAT, 2014). Os tumores de ovário de células germinativas e de cordão sexual são mais raros que os epiteliais (JAYSON, 2014; PRAT, 2014).

O câncer epitelial de ovário apresenta grande heterogeneidade clínica, histopatológica e molecular, podendo ser classificado em grupos distintos de tumores de comportamento peculiar. Tal característica dificulta o desenvolvimento de métodos eficazes para rastreamento e tratamento da doença (BERNS; BOWTELL, 2012; KARST; DRAPKIN, 2010; KUHN; KURMAN; SHIH, 2012; KURMAN; SHIH, 2010, 2011; SHIH; KURMAN, 2004; VAUGHAN et al., 2011). Além disso, os mecanismos envolvidos no surgimento do câncer de ovário ainda não estão bem estabelecidos e interações entre tecido ovariano, de tubas uterinas e microambiente devem ser consideradas para elucidação do mecanismo de carcinogênese desta neoplasia (CHENE et al., 2013; JONES; DRAPKIN, 2013; KARST; DRAPKIN, 2010; KURMAN; SHIH, 2010, 2011).

Na tentativa de identificar vias relacionadas à carcinogênese, os tumores de ovário foram divididos por Shih e Kurman (2004) de acordo com seu comportamento e características moleculares em tipo I, frequentemente relacionados com mutações em *BRAF* e *KRAS*, e tipo II, em sua maioria apresentando mutações em *TP53*.

A maior parte das pacientes diagnosticadas com câncer epitelial de ovário apresenta o subtipo seroso de alto grau, classificado como tipo II (CHENE et al., 2014; JAYSON, 2014; KARST, 2010; MALPICA et al., 2004; PRAT, 2014; SHIH; KURMAN, 2004; VANG; SHIH; KURMAN, 2009). Esses tumores apresentam crescimento rápido e metástases precoces. Raramente é identificada lesão precursora nos tumores desse tipo, o que pode ser devido a seu comportamento agressivo, apresentando rápida transição de carcinoma diagnosticado somente em nível microscópico para neoplasia clinicamente diagnosticada (SHIH; KURMAN, 2004).

O estadiamento do câncer de ovário é cirúrgico e serve para orientar o tratamento. De acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), pode-se dividir os tumores de ovário em Estádio I, quando limitado a um ou ambos os ovários; Estádio II, quando acomete um ou ambos os ovários e apresenta extensão pélvica; Estádio III, quando acomete um ou ambos os ovários com metástases confirmadas fora da pelve, em região peritoneal e/ou acometimento de linfonodos retroperitoneais ou inguinais; e Estádio IV, quando há metástases a distância, exceto peritoneal (COLOMBO et al., 2010; HEINTZ et al., 2006; PRAT, 2014)

Devido aos sintomas inespecíficos e à falta de biomarcadores confiáveis para a detecção precoce, cerca de 80% dos casos de câncer de ovário são diagnosticados em Estádios III e IV (JAYSON et al., 2014; HEINTZ et al., 2006; JEMAL et al., 2010).

O tratamento padrão para o câncer de ovário em estágio avançado é cirúrgico, associado a quimioterapia sistêmica (AGARWAL; LINCH; KAYLE, 2006; BONNEAU et al., 2015; COLOMBO et al., 2010; COOSEMANS; VERGOE; VAN GOOL, 2013; DANCEY, 2013; USHIJIMA, 2010; WEBERPALS; KOTI; SQUIRE, 2011).

A resistência à quimioterapia é um desafio para o tratamento do câncer em geral e associação entre drogas quimioterápicas tem sido feitas desde sua introdução por DeVita e colaboradores em 1960 (SAUNDERS, 2012; AU et al., 2015). Entretanto, desde 1996 o tratamento quimioterápico padrão para o câncer de ovário é a combinação de um composto de platina com paclitaxel, sem evidências que fundamentem mudança do tratamento de escolha para outras combinações de drogas ou adição de uma terceira droga (COLOMBO et al., 2010).

Para mulheres com câncer de ovário seroso de alto grau, a taxa de sobrevida em cinco anos é de 35 a 40% e depende, não só do estágio da doença e da qualidade da cirurgia citorrredutora, mas também de outros fatores que ainda não estão bem estabelecidos, sendo o

intervalo entre a quimioterapia e a recorrência da doença um importante indicativo de prognóstico (BERNS; BOWTELL, 2014; IGNATOV et al., 2014; VERGOTE et al., 2010).

Embora a resposta inicial à quimioterapia que se segue a cirurgia citorrredutora primária seja efetiva para a maioria das pacientes, estima-se que cerca de 20 a 30% delas apresentará recorrência tumoral nos primeiros seis meses do tratamento (BERNS; BOWTELL, 2012; MARCUS et al., 2014). O câncer de ovário seroso de alto grau caracteriza-se por sensibilidade inicial ao tratamento quimioterápico, com desenvolvimento de resistência crescente a cada recorrência (JAYSON et al., 2014).

De acordo com o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), o câncer epitelial de ovário seroso de alto grau pode ser considerado resistente ao tratamento com platina, quando a progressão da doença ocorre dentro de seis meses do último ciclo de tratamento, ou sensível, quando há resposta completa à quimioterapia por pelo menos seis meses após o tratamento. Entretanto, para as pacientes que apresentam resposta nos primeiros seis meses após o término da quimioterapia, existe uma ampla variação no tempo de intervalo livre de doença, sendo que a definição do fenótipo de resistência e, principalmente, de sensibilidade, varia entre os estudos (CHEN et al., 2015; CHIEN et al., 2013; DAVIS; TIENKER; FRIEDLANDER, 2014; KOTI et al., 2013; KOTI et al., 2015; PARK et al., 2013).

A resistência ao quimioterápico é um processo dinâmico, multifatorial e sofre influência de elementos como variabilidade individual de resposta a droga de escolha, linhagem celular, grau de diferenciação do tumor e microambiente. A resistência pode ser primária (inata), quando é conferida por mecanismos prévios à exposição aos agentes quimioterápicos, ou secundária (adquirida), quando se desenvolve em resposta a pressão seletiva que se segue ao tratamento, com acúmulo de alterações genéticas, resultando no fenótipo de resistência. O fato de que características inerentes às células tumorais interagem com o microambiente em que se encontram é um dos obstáculos para o tratamento do câncer *in vivo* (AU et al., 2015; CHEN et al., 2015; FODALE et al., 2011; MEADS; GATENBY; DALTON, 2009).

O padrão imune pré-existente ao tratamento relaciona-se com resposta à quimioterapia em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de ovário seroso de alto grau (BAXEVANIS; PAPAMICHAIL; PEREZ, 2013; HERBST et al., 2014; KOTI et al., 2013; KOTI et al., 2015).

O infiltrado linfocitário peritumoral correlaciona-se com a sobrevida (JIANG; WU; LU, 2013) e tem se destacado como nova potencial ferramenta para estabelecer prognóstico (AU et al., 2015; GALON et al., 2014; GALON et al., 2013; MLENICK et al., 2010;

MELECNIK et al. 2011), podendo complementar o sistema *tumor-node-metastasis* (TNM), método clássico para estadiamento que baseia-se em tamanho do tumor primário (T), número de linfonodos regionais acometidos (N) e presença de metástases à distância (M) para fornecer informações de prognóstico (MELECNIK et al., 2011). O fato de pacientes com o mesmo estadiamento pelo sistema TNM frequentemente apresentarem desfechos clínicos variados, confirma que a exclusão da influência do microambiente tumoral pode ser fator limitante neste método (GALON et al., 2014).

O papel do sistema imune no combate ao câncer foi proposto em 1909 por Paul Erlich, mas ganhou destaque somente cerca de 50 anos depois, a partir do conceito de imunovigilância tumoral, no qual antígenos tumorais específicos permitiriam ao hospedeiro reconhecer o tumor como corpo estranho e tentar eliminá-lo. Esse conceito foi preterido até que estudos de componentes do sistema imune, como os baseados em modelos animais deficientes em receptores de INF- $\gamma$ , Fator de Transdução de Sinal e Ativador de Transcrição 1 (STAT1) e perforina, um componente da resposta T citotóxica e de células *Natural Killer* (NK), trouxeram de volta o interesse na relação entre imunologia e câncer (DUNN et al., 2002; DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).

O conceito de imunovigilância foi ampliado pela ideia de imunoedição tumoral, que compreende três processos: eliminação de parte das células tumorais pelo sistema imune; equilíbrio entre o crescimento e eliminação do tumor; escape das células tumorais selecionadas e desenvolvimento do câncer (Figura 1) (DUNN et al., 2002; DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).



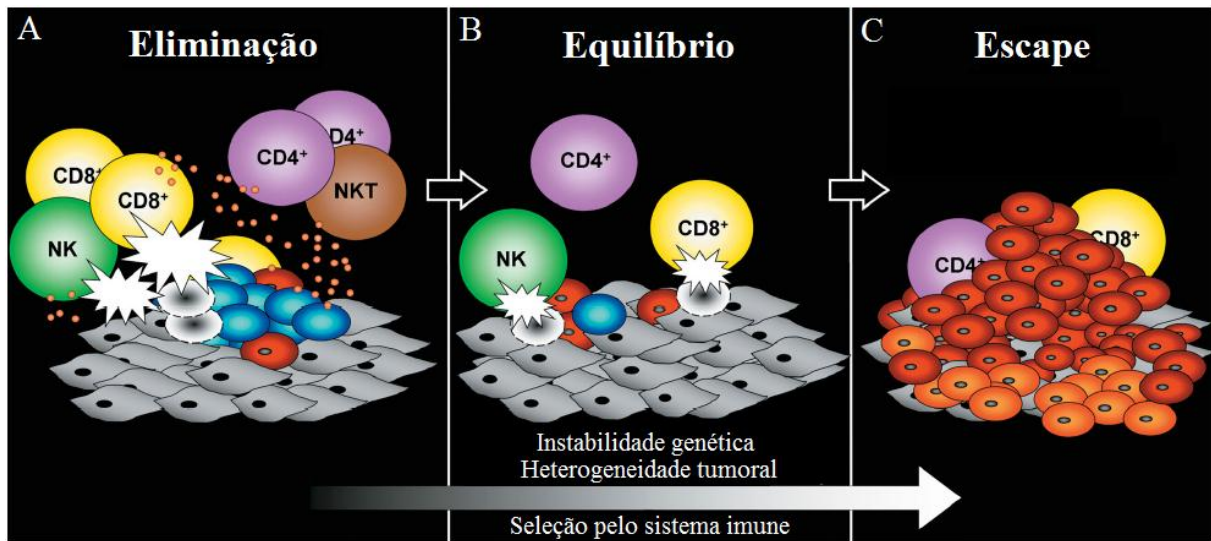


Figura 1. Os três Es da imunoeedição do câncer. A imunoeedição do câncer compreende três processos: (A) Eliminação corresponde a imunovigilância. (B) Equilíbrio representa o processo pelo qual o sistema imune seleciona e/ou promove a geração de células tumorais variantes com capacidade crescente de sobreviver ao ataque imune. (C) Escape é o processo no qual o tumor imunologicamente moldado cresce descontroladamente em um hospedeiro imunocompetente. Em A e B, estão representadas células do tumor em desenvolvimento (azul), células variantes tumorais (vermelho) e estroma adjacente e células não neoplásicas (cinza); em C, estão representadas células variantes tumorais adicionais (laranja) que se formaram como resultado do processo de equilíbrio. Diferentes populações de linfócitos são mostradas. Os pequenos círculos laranjas representam citocinas e os flashes brancos representam atividade citotóxica contra as células tumorais. Adaptado/ traduzido com permissão de Macmillan Publishers Ltd: **Nature Immunology** (DUNN et al., 2002), Copyright © 2002

Os mecanismos pelos quais o tumor escapa do sistema imune são alvos de diversos estudos. A indução de tolerância central, quando as células T auto-reativas são destruídas ou convertidas em T regulatórias no timo, ou periférica, quando o crescimento tumoral induz tolerância periférica a células T, contribui para a evasão tumoral. Além disso, o fato da imunodeficiência ser direcionada ao tumor, e não generalizada, indica habilidade do tumor em gerar um microambiente imune favorável a sua sobrevivência (SWANN; SMYTH, 2007). Os tumores podem modular os níveis de citocina e fatores de crescimento liberados pelas células imunes com o objetivo de manter ativação de vias oncogênicas e desenvolver um ambiente resistente ao tratamento quimioterápico (HOLOHAN et al., 2013).

Um aspecto curioso em relação aos tumores de ovário é o fato de que muitas pacientes que apresentam recorrência respondem bem ao mesmo tratamento quimioterápico utilizado previamente. Essa característica, conhecida como recorrência sensível à platina, sugere necessidade de complementação à teoria da imunoeedição tumoral (CHIEN et al., 2013).

Chien e colaboradores (2013) propuseram um modelo para explicar a recorrência no câncer de ovário, apresentado na Figura 2. Nesse modelo, assim como na teoria de imunoeedição tumoral, o tumor refratário é constituído principalmente por células

intrinsecamente resistentes ao tratamento, não apresentando remissão (Figura 2A), e o tumor resistente é formado principalmente por células sensíveis, apresentando resposta inicial ao tratamento, embora as células resistentes presentes acabem por provocar resistência primária, com recorrência dentro dos primeiros seis meses após o término do tratamento (Figura 2B). Complementando a teoria da imunoeedição tumoral, esse modelo propõe alguns mecanismos para explicar a recorrência sensível à platina. Células quiescentes tumorais, por exemplo, quando em ambiente favorável, seriam estimuladas. Elas levariam à recorrência sensível à platina (Figura 2C) ou à resistência adquirida após várias recorrências (Figura 2D), na dependência do fenótipo das células originais. Outro mecanismo para a recorrência sensível à platina seria a influência da matriz extracelular na resposta à quimioterapia (figura 2E), sendo a resistência ou sensibilidade conferida de acordo com o microambiente tumoral. A resistência apresentada seria influenciada, portanto, pela heterogeneidade das células que constituem o tumor (Figura 2F) (CHIEN, et al., 2013).

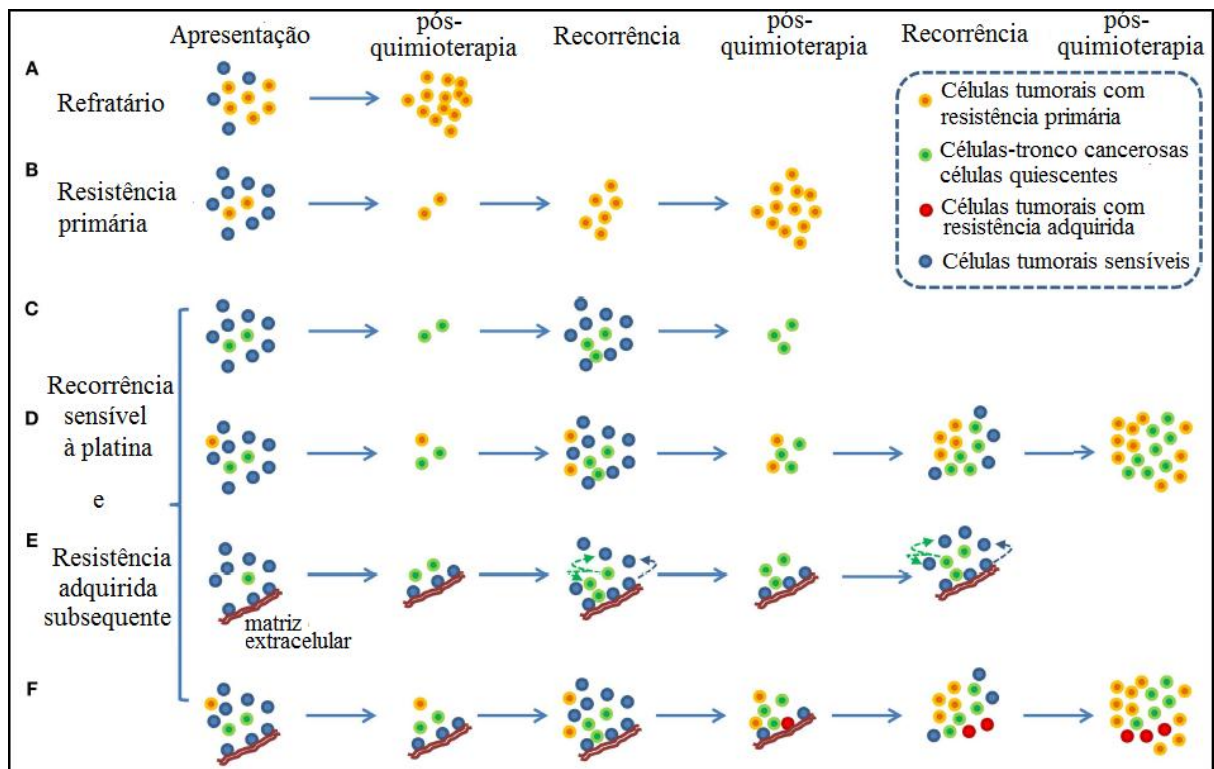


Figura 2. Modelos propostos para recorrência sensível e resistente à platina. (A) tumor refratário. (B) tumor resistente. (C) recorrência sensível à platina devido a existência de células quiescentes. (D) resistência adquirida à platina. (E) resistência sensível à platina devido à interação com a matriz extracelular. (F) Modelo unificado de resposta ao tratamento. Adaptado/traduzido de CHIEN et al. (2013), sob os termos de Creative Commons (CC BY) [Copyright](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) © 2013 Chien, Kuang, Landen e Shridhar.

A existência de uma matriz extracelular que, associada às células neoplásicas, influencia o fenótipo quanto à resistência ou sensibilidade ao tratamento fortalece a ideia de que o comportamento tumoral é dependente do contexto em que está inserido (CHIEN et al., 2013). O microambiente tumoral deve, portanto, ser considerado na procura por biomarcadores de predição de resposta terapêutica.

Leucócitos e seus mediadores solúveis podem tanto favorecer como inibir a progressão tumoral, dependendo do seu contexto, o que dificulta o estabelecimento das estratégias de tratamento por associação de imunoterapia à terapia citotóxica convencional (SHIAO et al., 2011). O fato de que células imunes podem ser encontradas em diferentes áreas do tecido, como centro do tumor, margem invasora ou estruturas linfoides terciárias adjacentes, e de que a localização dessas células varia conforme o tipo de tumor sugerem que populações diferentes de células imunes têm funções distintas no desenvolvimento de cada neoplasia (BINDEA et al., 2013; FRIDMAN et al., 2012; FRIDMAN et al., 2014). A caracterização quanto ao número, tipo e localização das células imunes em tumores primários abre espaço para futuras abordagens terapêuticas para o câncer, com fármacos imunomoduladores (BAXEVANIS; PAPAMICHAIL; PEREZ, 2013; CHESTER et al., 2015; VAUGHAN et al., 2011). Análises dessas características em populações de linfócitos nos cânceres de mama (ASCIERTO et al., 2012; DeNARDO et al., 2011; ISSA-NUMMER et al., 2013; LIU et al., 2012), colorretal (BAXEVANIS; PAPAMICHAIL; PEREZ, 2013; BINDEA et al., 2013; CANNA et al., 2005; GALON et al., 2006; MLECNIK et al., 2010; MLECNIK et al., 2011; KLINTRUP et al., 2005; OGINO et al., 2009; ZLOBEC; TERRACIANO; LUGLI, 2008), próstata (KÄRJÄ et al., 2005), esôfago (SCHUMACHER et al., 2001), carcinoma de células renais (NAKANO et al., 2001), melanoma (LANDÁNYI et al., 2007) e ovário (ZHANG et al., 2003) foram relacionadas com desfecho clínico ou predição de resposta à quimioterapia. Populações de células T citotóxicas CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> e células T de memória CD45RO<sup>+</sup> correlacionam-se com maior intervalo livre de doença e maior sobrevida global para a maioria dos tumores. Aparentemente, as populações de células relacionadas com resposta Th1 e as citocinas produzidas por elas, como INF- $\gamma$ , também estão relacionadas com melhor prognóstico. Presença de células T regulatórias foi relacionada com desfecho clínico variável de acordo com o tipo de tumor estudado (revisado por FRIDMAN, 2012).

No câncer de ovário, observa-se associação de células T citotóxicas intratumorais com melhor prognóstico. Zhang e colaboradores (2003) mostraram correlação de maior sobrevida e maior intervalo livre de doença com células T intratumorais no câncer epitelial de ovário em Estádio III ou IV. Associação do infiltrado linfocitário tumoral intraepitelial com melhor

prognóstico foi reforçada por Hwang e colaboradores (2011), em estudo de metanálise, apontando principalmente para as células TCD8+ como marcadores no câncer de ovário. A presença de células T regulatórias foi relacionada com supressão de resposta imune tumor-específica e redução da sobrevida (CURIEL et al., 2004) e redução de sobrevida global e da sobrevida livre de tumor (WOLF et al., 2005), mas também foi associada a aumento da sobrevida em tecidos derivados de tumor ovariano (LEFFERS et al., 2009; MILNE et al., 2009).

Identificação do padrão molecular e sua caracterização como alvo terapêutico são fundamentais para desenvolvimento dos novos modelos de tratamento (COOSEMANS; VERGOE; van GOOL, 2013; RESCIGNO et al., 2013; SAUNDERS et al., 2012).

A expressão gênica é regulada por citocinas, que desencadeiam eventos de sinalização intracelular a partir da ligação com seus receptores, controlando a resposta imune no tecido tumoral (KOROMILAS; SEXL, 2013). A observação de resposta diferencial ao tratamento pressupõe diferenças na expressão de genes envolvidos em vias associadas à resposta ao quimioterápico entre os tumores sensíveis e resistentes (BAXEVANIS; PAPAMICHAIL; PEREZ, 2013; HERBST et al., 2015; KOTI et al., 2013; KOTI et al., 2015).

A comparação de perfis de expressão gênica obtidos através de análise de tumores de ovário serosos de alto grau revelou um conjunto de 204 genes diferencialmente expressos entre tumores sensíveis e resistentes à quimioterapia (KOTI et al., 2013). O estudo das vias envolvendo maior proporção desses genes identificou as vias de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e de quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK) como as principais relacionadas a resposta diferencial entre os dois grupos de tumores com resposta distinta ao tratamento (KOTI et al., 2013).

Genes das vias de sinalização NF- $\kappa$ B e ERK também foram identificados em outro estudo de perfil de expressão gênica em tumores de ovário de alto grau de pacientes com maior intervalo livre de doença (BARLIN et al., 2013)

A via NF- $\kappa$ B é fundamental no processo inflamatório, o que reforça a necessidade de considerar a regulação imune no contexto da resposta diferencial à quimioterapia. Estudo do perfil de expressão de 184 genes revelou diferenças na expressão de 11 genes entre tumores sensíveis e resistentes, sendo o Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1 (*STAT1*) o mais diferencialmente expresso, sugerindo seu uso como biomarcador de resposta à quimioterapia (KOTI et al., 2015) (Figura 3).

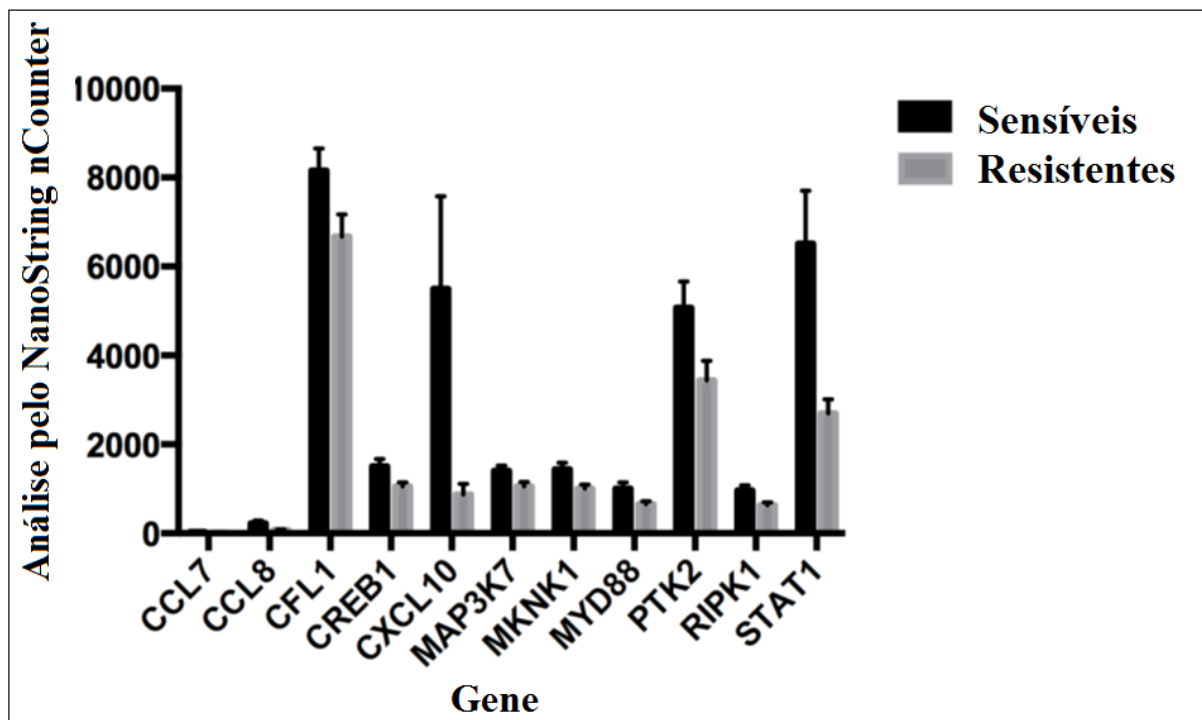


Figura 3. Comparação dos níveis de expressão de genes inflamatórios em tumores de ovário serosos de alto grau sensíveis e resistentes à quimioterapia. O perfil de marcadores inflamatórios nas duas coortes do estudo foi determinado com a plataforma *NanoString nCounter*. Normalização dos dados foi feita utilizando o programa *NanoString nSolver* seguido de aplicação de teste de Bonferroni para múltiplas comparações utilizando o programa *Graphpad Prism* para determinar os genes diferencialmente expressos. Os 11 genes mais diferencialmente expressos com significância estatística ( $P < 0,05$ ) estão representados na figura. Traduzido de KOTI et al. (2015), sob os termos de Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 (CC BY-NC 4.0) [Copyright](#) © 2015 Cancer Research UK.

STAT1 pertence à família de fatores Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (STATs), proteínas que foram nomeadas devido a sua dupla função: receber o sinal de uma proteína na superfície celular e levá-lo até o núcleo, estimulando a transcrição gênica (STARK; DARNELL, 2012).

Os STATs apresentam-se como fatores citoplasmáticos latentes. Uma das formas de ativação dos STATs ocorre a partir de estímulo por citocinas, incluindo os três tipos de interferon. Proteínas membros da família Janus-Quinase (JAK) ativam STAT1 por fosforilação na tirosina. Ocorre então, por mecanismos ainda desconhecidos, sua migração para o núcleo, onde irá regular a transcrição gênica (BRIVANLOU; DARNELL, 2002; MEISSL et al., 2015).

STAT1 atua de maneira complexa na tumorigênese, podendo promover ou suprimir o crescimento do tumor. A atividade supressora tumoral ocorre por regulação de fatores que resultam em inibição do ciclo celular e morte, como as ciclinas, quinases dependentes de

ciclina (CDK), interação com p53 e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Possivelmente STAT1 também está relacionada com autofagia (MEISSL et al., 2015).

STAT1 ativado por INF estimula a transcrição miRNA29, que regula negativamente CDK6, e de p21WAF1 e p27KIP1, inibidores de CDKs. Estimula também a transcrição de proteína Bak, membro pró-apoptótico da família Bcl-2, e de caspases 1 e 8 e inibe a transcrição de Bcl-2 e Bcl-XL, membros anti-apoptóticos da família Bcl2. Além disso, aumenta a expressão de receptor de fator de necrose tumoral FAS e seu ligante, FASL, e de Ligante Indutor de Apoptose Relacionado a TNF (TRAIL) e de seu receptor, Receptor de Morte 5 (DR5). STAT1 facilita o efeito supressor tumoral de p53 por interação direta e por diminuição da proteína Mdm2, um inibidor de sua transcrição. Além da regulação desses fatores descritos, que levam a parada do ciclo celular e morte, STAT1 diminui expressão de genes relacionados a sobrevivência celular a partir de sua interação com a proteína de domínio de morte associada a receptor de Fator de Necrose Tumoral 1 (TRADD) (MEISSL et al., 2015).

STAT1 também participa da imunoeedição tumoral a partir de aumento da citotoxicidade de células NK, linfócitos T citotóxicos e promoção da função apresentadora de antígenos tumorais por células dendríticas, além de influenciar a expressão de receptores de superfície nas células tumorais, facilitando sua eliminação pelo sistema imunológico. Além disso, ativação de STAT1 influencia na angiogênese, estimulando fatores anti-angiogênicos e inibindo fatores pró-angiogênicos (MEISSL et al., 2015).

As funções como supressor tumoral de STAT1 estão ilustradas na Figura 4.

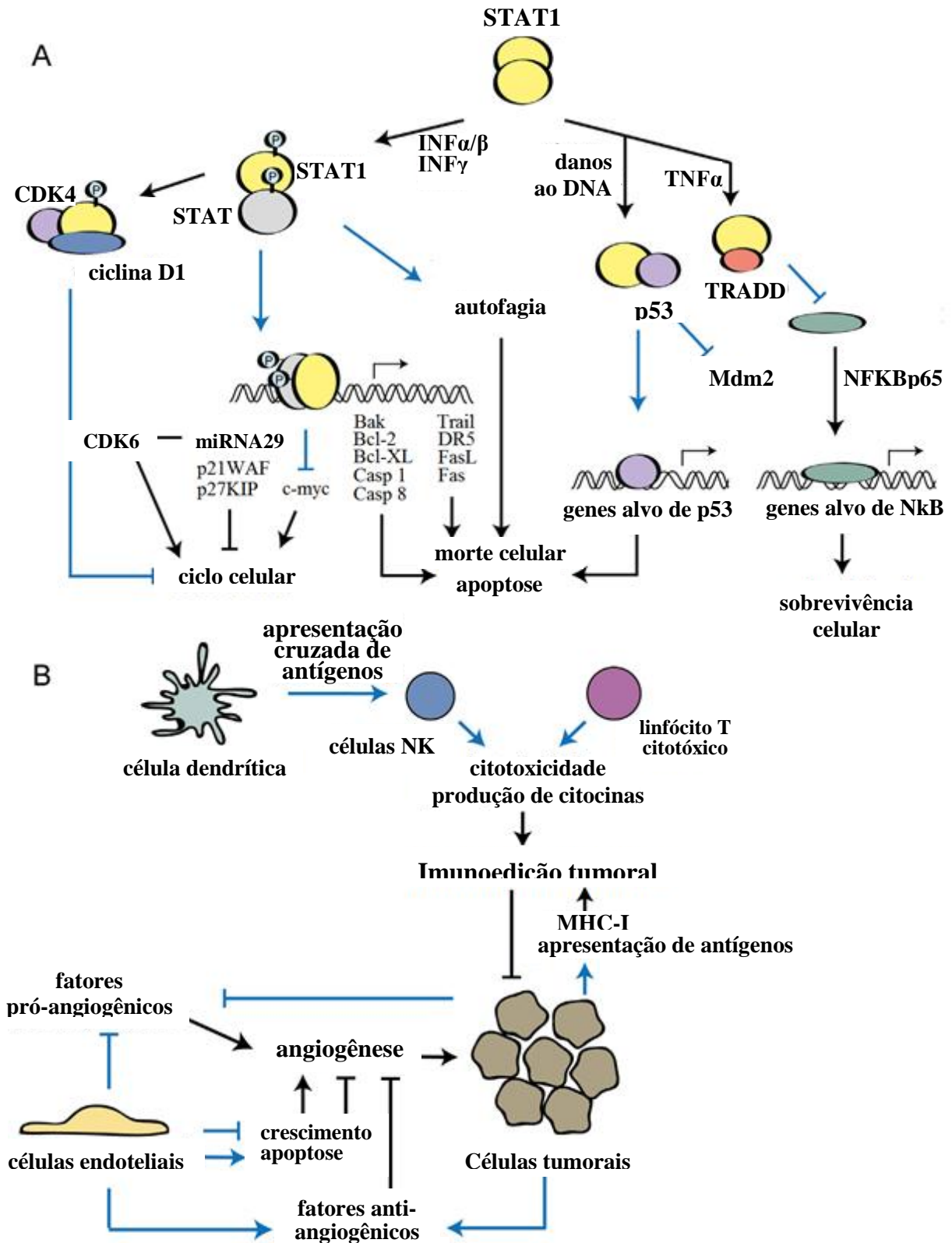


Figura 4. Funções de supressão tumoral de STAT1. (A) mecanismos moleculares de inibição do ciclo celular e morte celular. (B) participação na imunoterapia do câncer e angiogênese. Adaptado/ traduzido de MEISSL et al. (2015), sob os termos de Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 (CC BY-NC-ND 4.0) Copyright © 2015 MEISSL, MACHO-MASCHLER, MÜLLER e STROBL.

Uma característica que se destaca nas pacientes que respondem a terapias imunomoduladoras é a pré-existência de elevado número intratumoral de linfócitos TCD8+ (HERBST et al., 2014; TENG et al., 2015), o que enfatiza a necessidade de estratégias complementares para ativar resposta imune citotóxica anti-tumoral.

Sabe-se que o interferon-gama (INF- $\gamma$ ) ativa e produz homodímeros de STAT1. Regulação de STAT1 por INF leva a expressão de CXCL10, uma quimiocina angiostática, por células dendríticas apresentadoras de antígeno, células T, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras. Quando CXCL10 liga-se em seu receptor, CXCR3, ocorre resposta imune Th1 e recrutamento de células T CD8+ (MILNE et al., 2009; NELSON, 2010; RAINCZUK et al., 2012; RAINCZUK et al., 2014).

Estudos das vias de transdução de sinal e do papel chave dos marcadores moleculares que se relacionam com a resistência/ sensibilidade aos quimioterápicos no tumor epitelial de ovário são de fundamental importância (TOMAO et al., 2014). A identificação de biomarcadores imunológicos locais e sistêmicos do paciente poderá facilitar a decisão terapêutica, visto que grande número de células T citotóxicas e de memória vem sendo associadas a maior intervalo livre de doença (ASCIERTO et al., 2013).



## 2 JUSTIFICATIVA

A heterogeneidade dos tumores e a influência do microambiente são fatores limitantes na validação clínica de biomarcadores preditivos e de prognóstico. A seleção de um grupo de amostras de tecido tumoral de ovário, compreendendo apenas tumores serosos de alto grau não submetidos à quimioterapia prévia é um caminho importante para a identificação do comportamento dessa amostra homogênea, possibilitando melhor caracterização da doença e possivelmente seleção de biomarcadores confiáveis, com possibilidade de surgimento de novas terapias (COFFELT; VISSER, 2015; KLEMM; JOYCE, 2015).

Dados sugerem que a expressão de *STAT1* no câncer de ovário seroso de alto grau facilite resposta imune contra o câncer, associando-se a melhor prognóstico, com alta expressão relacionada a maior intervalo livre de doença e menor expressão de *STAT1* encontrada em tumores refratários ao tratamento quimioterápico, com menor sobrevida livre de doença (KOTI et al., 2015).

Diante da dificuldade de validação de marcadores biológicos e a partir da hipótese de que o microambiente inflamatório tumoral pré-existente determinado pela expressão de *STAT1* e várias citocinas efetoras facilitam a resposta imune contra o câncer de ovário, a proposta do nosso estudo foi avaliar a expressão de *STAT1* e correlacioná-la com resposta à quimioterapia a partir da análise das curvas de sobrevida livre de doença e de sobrevida global.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar a influência da expressão do gene *STAT1* no tumor de ovário seroso de alto grau na resposta ao tratamento quimioterápico.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- › Analisar o nível de expressão proteica do gene *STAT1* em amostras de tecido de tumor de ovário seroso de alto grau, através de técnica de imunistoquímica.
- › Avaliar a existência de correlação entre expressão de *STAT1* e o perfil de resposta à quimioterapia a partir da análise do tempo de sobrevida livre de doença e de sobrevida global.
- › Avaliar o papel do *STAT1* como biomarcador preditivo de resposta ao tratamento quimioterápico

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Casuística

Trata-se de estudo de coorte reconstituído, no qual foram avaliados 154 casos de pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau atendidas no Serviço de Oncologia Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) e do Hospital de Câncer de Barretos de janeiro de 1990 a abril de 2010. A avaliação foi realizada a partir de banco de dados e de lâminas de microarranjo tecidual (TMA) de tumores fixados em formalina e embebidos em parafina de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico para câncer de ovário, confeccionados em estudo prévio de Sousa (2013). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de acordo com processo HCRP nº 7549/2015 (ANEXO).

#### 4.1.1 Critério de inclusão

Foram incluídas no estudo todas as amostras correspondentes a casos de câncer de ovário do tipo seroso de alto grau não submetidos previamente à quimioterapia e que tiveram dados clínicos suficientes para análise.

#### 4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo casos clínicos que não preenchiam o critério acima ou que apresentavam amostras do tumor com quantidade insatisfatória de tecido para a metodologia proposta. Além disso, foram excluídos os casos com escore discordante entre os dois pesquisadores na análise imunohistoquímica para STAT1.

## 4.2 Material

Para o estudo prévio de Sousa (2013), foram construídas lâminas de microarranjo tecidual (TMA) a partir de revisão de lâminas e blocos de parafina de tumores epiteliais ovarianos obtidos de ooforectomias realizadas em pacientes acompanhadas no serviço de Ginecologia Oncológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital do Câncer de Barretos, no período de janeiro de 1990 a abril de 2010. Desta amostra, 154 pacientes apresentaram tumor seroso de alto grau, sendo selecionadas para o presente estudo.

Para a construção dos blocos de TMA no estudo de Sousa (2013), os blocos de parafina foram revisados por patologistas. Para cada caso, amostras de um milímetro de tecido ovariano com alta porcentagem de tumor (>70%) foram removidas dos blocos de parafina originais e transferidas para o bloco receptor, com dois milímetros de distância entre cada amostra, utilizando o aparelho *Manual Tissue Arrayer I* (Beecher Instruments, Silver Spring, USA).

No bloco receptor foram feitos cortes de três micrômetros, com micrótomo manual. Para transferir os cortes dos blocos de microarranjo para as lâminas de TMA foram utilizados tanto sistema com lâminas especiais e fita adesiva comercial (*Paraffin Tape-Transfer System*, da *Instrumedics Inc.*), como o método com banho-maria. A presença de tecido tumoral foi verificada por microscopia de luz, corando-se o primeiro corte com Hematoxilina & Eosina (H&E) (SOUSA, 2013).

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Parâmetros clínicos, cirúrgicos e histopatológicos

As informações quanto à idade da paciente, qualidade da cirurgia citorrredutora realizada, estadiamento cirúrgico, tipo e grau de diferenciação histológico e esquema quimioterápico utilizado foram retiradas de banco de dados derivado de estudo de Sousa (2013), cuja metodologia foi considerada adequada para ser replicada no presente estudo.

Estes dados foram obtidos de prontuários médicos (SOUSA, 2013). A seguir, estão descritos conceituações metodológicas utilizadas em ambos os estudos:

A citorredução cirúrgica foi definida pelo critério do *Gynecology Oncology Group* (GOG), definida como ótima a citorredução com tecido tumoral residual menor ou igual a um centímetro em seu maior diâmetro e subótima a citorredução com tecido tumoral residual maior que um e menor que dois centímetros em seu maior diâmetro (SOUSA, 2013). As pacientes nas quais não foi possível a realização de cirurgia citorrredutora foram excluídas do presente estudo.

Para estadiamento das pacientes, foi utilizado o sistema da FIGO, que divide os tumores de ovário em Estádio I, quando limitado a um ou ambos os ovários; Estádio II, quando acomete um ou ambos os ovários e apresenta extensão pélvica; Estádio III, quando acomete um ou ambos os ovários com metástases confirmadas fora da pelve, em região peritoneal e/ou acometimento linfonodal; e Estádio IV, quando há metástases a distância, exceto peritoneal (PRAT, 2014; COLOMBO et al., 2010).

Para classificar os tipos de tumor, foi utilizado critério histopatológico baseado na morfologia celular. Os tumores de ovário do tipo seroso foram subclassificados a partir do grau histológico, baseado na proporção de estruturas glandulares ou papilares com a área sólida do tumor, sendo selecionados para o presente estudo os que obtiveram classificação histológica 2 e 3, correspondentes aos de alto grau (SOUSA, 2013; VANG; SHIH; KURMAN, 2009).

Como as informações foram retiradas de banco de dados, não foi possível detalhar ou complementar a investigação para melhor caracterização dos parâmetros aplicados.

#### 4.3.2 Critério para análise de sobrevivência

Todas as amostras tumorais selecionadas para análise foram retiradas em cirurgias realizadas previamente à exposição das pacientes ao tratamento quimioterápico, para avaliar a influência da expressão do *STAT1* na resistência primária, evitando influência de resistência secundária à quimioterapia.

A duração da sobrevida livre de doença foi considerada o tempo decorrido entre o início do tratamento da paciente e a presença de recorrência com doença local, regional ou à

distância. Os dados das pacientes que não apresentaram recorrência foram censurados com a data do último retorno.

A duração da sobrevida global foi considerada o tempo decorrido entre o início do tratamento da paciente e o óbito por qualquer causa. A data do último retorno foi utilizada como censura para os casos em que a data de morte não foi registrada.

Foi considerada como início do tratamento a data da cirurgia citorrredutora primária.

#### 4.3.3 Imunoistoquímica

Os casos de tumor de ovário seroso distribuídos em lâminas de TMA foram submetidos à técnica de imunoistoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-STAT1 (Abcam; #ab2415). As lâminas foram coradas utilizando o aparelho BenchMark XT automated stainer (Ventana Medical System, Inc.). A concentração ótima do anticorpo anti-STAT1 (Abcam, #ab2415) foi determinada a partir de uma série de diluições em tumor de ovário seroso de alto grau e em tecidos normais de ovário.

Para recuperação antigênica, foi utilizado reagente pré-diluído Cell Conditioning 1 (Ventana Medical System, Inc.; #950-124) por 60 minutos. O anticorpo primário anti-STAT1 (1:2000) foi adicionado e as lâminas ficaram incubadas a 37°C por 60 minutos. As reações foram realizadas utilizando o produto ultraView universal DAB Detection Kit (Ventana Medical System, Inc.; #760-500). As lâminas foram tratadas com hematoxilina (Ventana Medical System, Inc.; #760-2021) e Bluing Reagent (Ventana Medical System, Inc.; #760-2037) por 4 minutos.

#### 4.3.4 Análise de imagens

As lâminas de TMA foram escaneadas utilizando o programa Aperio ScanScope™, conservadas e visualizadas em sistema digital para análise manual.

A análise da expressão de *STAT1* pela técnica de imunoistoquímica foi realizada conforme metodologia proposta por Koti et al. (2015), utilizando escore de intensidade com valores de 0 a 3: escore 0 para negativo; escore 1 para expressão fraca; escore 2 para

expressão moderada e escore 3 para expressão forte de anti-*STAT1* (Abcam#ab2415) no tecido analisado (figura 5).

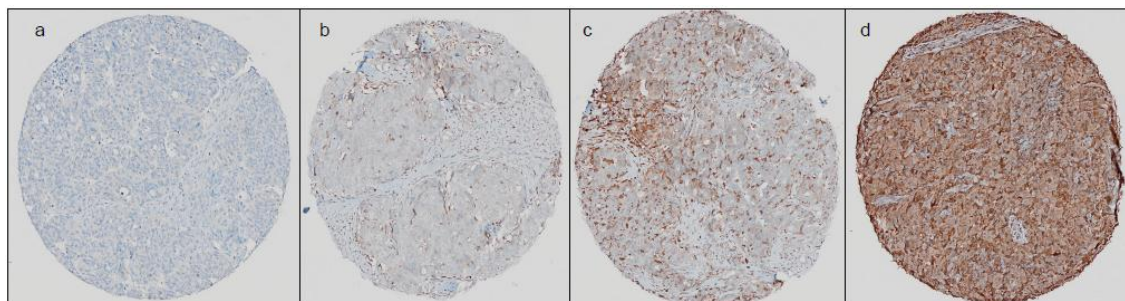


Figura 5. Escores para análise por imunohistoquímica da expressão de *STAT1* em microarranjo tecidual. Critério de intensidade: a) amostra de tecido classificada como 0 – negativo; b) amostra de tecido classificada como 1 – expressão fraca; c) amostra de tecido classificada como 2 – expressão moderada; d) amostra de tecido classificada como 3 – expressão forte. Adaptado/ traduzido de Koti et al. (2015), sob os termos de Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 (CC BY-NC 4.0)

Foram realizadas análises independentes das lâminas por dois pesquisadores, sem associação dos dados clínicos com as amostras em análise. As amostras de tecido que receberam pontuação discordante entre os dois pesquisadores foram excluídas.

No caso de pacientes que apresentavam duas amostras de tecido tumoral para análise (casos em duplicata), quando um observador classificou as duas amostras com escore diferente, a comparação foi feita a partir do cálculo da média aritmética simples dos valores atribuídos.

A expressão de *STAT1* foi posteriormente dicotomizada, sendo considerada baixa para valores entre 0 e 1 e alta para valores entre 1,5 e 3.

#### 4.4 Seleção dos casos

##### 4.4.1 Seleção dos casos a partir da análise imunohistoquímica

Das 154 pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau, 18 foram excluídas por não apresentarem amostra de tecido tumoral suficiente para análise, restando 136 pacientes. Destas, 106 (77,94%) obtiveram a mesma classificação final (concordantes) e 30 (22,06%)

apresentaram classificação final diferente (discordantes) das amostras entre os dois pesquisadores e foram excluídas do estudo, conforme descrito a seguir:

Entre as 136 pacientes com amostra de tecido suficiente para análise por técnica de imunoistoquímica, 71 apresentavam apenas uma amostra de tecido tumoral e 65 apresentavam duas amostras de tecido tumoral (duplicatas) nas lâminas de TMA.

Das 71 pacientes com única amostra de tumor nas lâminas, 57 foram concordantes entre os dois pesquisadores e selecionadas para o estudo e 14 foram discordantes, sendo excluídas.

As 65 pacientes que apresentavam amostras em duplicata para análise foram classificadas da seguinte forma: as duas amostras de cada paciente foram analisadas por um pesquisador de cada vez e receberam um escore de 0 a 3. As que obtiveram o mesmo escore nas duas amostras foram classificadas com esse valor para comparação entre os pesquisadores. Para as que receberam escore diferente, foi calculada a média aritmética simples para classificação final e esse foi o valor utilizado para comparação entre os pesquisadores.

Dessa forma, a partir das análises de cada pesquisador das amostras em duplicata das 65 pacientes, 32 tiveram o mesmo escore e 33 obtiveram escores diferentes entre as duas amostras. Todas 32 pacientes com o mesmo escore entre as duas amostras foram concordantes e selecionadas para o estudo. Para as 33 pacientes com amostras em duplicata com escore diferente, a comparação das médias aritméticas dos pesquisadores mostrou 17 pacientes com valores concordantes entre eles, que foram selecionadas para o estudo, e 16 com valores discordantes, que foram excluídas da análise.

A seleção dos casos está ilustrada no fluxograma da Figura 6.



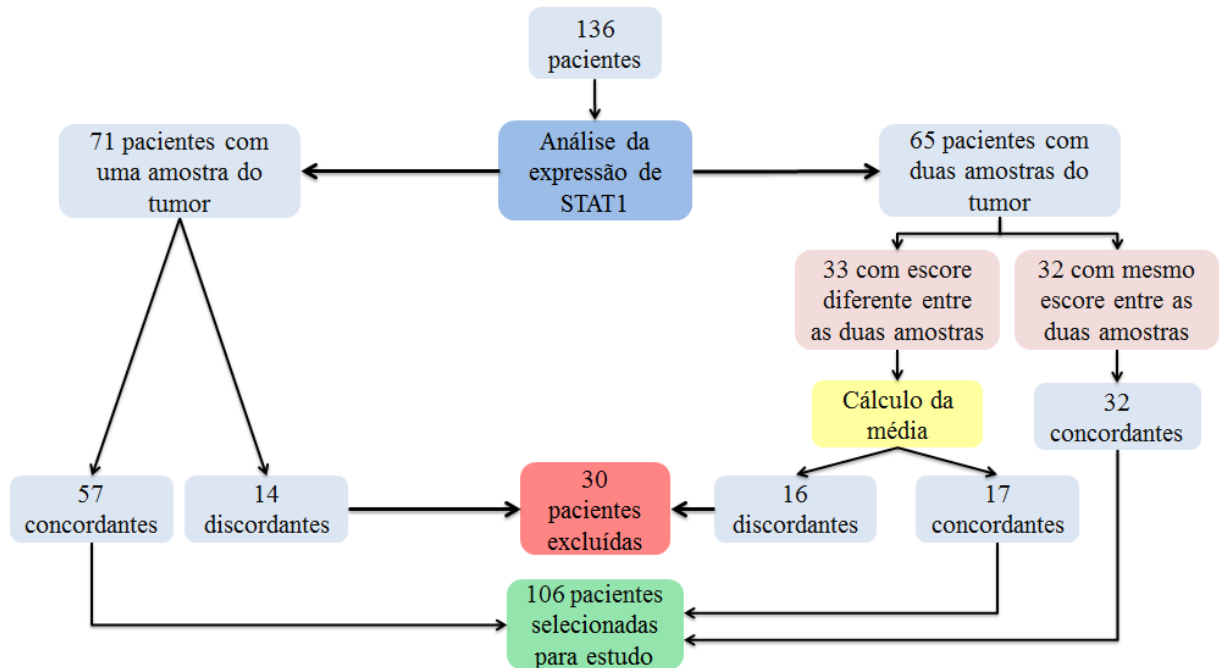


Figura 6. Fluxograma de seleção das pacientes para estudo da influência de *STAT1* na resposta a quimioterapia, a partir do resultado da análise da expressão de *STAT1* pela técnica de imunohistoquímica.

#### 4.4.2 Seleção dos casos a partir dos dados clínicos e cirúrgicos

No conjunto das 106 pacientes selecionadas com base no escore de *STAT1*, 27 foram excluídas da análise por não terem sido submetidas à citorredução, 8 foram excluídas por não terem sido submetidas ao tratamento quimioterápico, 2 foram excluídas por terem sido submetidas à quimioterapia antes da retirada da amostra tumoral a ser analisada e 3 foram excluídas por apresentarem dados clínicos insuficientes para análise, restando para análise dados de 66 pacientes.

#### 4.5 Análise estatística

Foram conduzidas análises exploratórias dos dados clínicos, histopatológicos e expressão de *STAT1* por imunohistoquímica, entre as quais estatísticas descritivas e correlação de Pearson entre as variáveis incluídas no presente estudo.

Curvas de sobrevivência para intervalo livre de doença e sobrevida global, considerando as classes baixa expressão e alta expressão de *STAT1*, foram obtidas pelo método Kaplan-Meier, e a significância da homogeneidade entre as classes foi avaliada pela estatística Log-Rank (Mantel-Cox).

Modelos de regressão de risco proporcional de COX foram ajustados para avaliar o efeito isolado da *STAT1* sobre intervalo livre de doença e sobrevida global, com utilização do procedimento PHREG do sistema SAS. O método *stepwise* foi utilizado para determinar quais variáveis deveriam ser incluídas nos modelos. Para intervalo livre de doença foram incluídas as variáveis *STAT1*, Estadiamento e Citorredução; e para Sobrevida global foram incluídas as variáveis *STAT1* e Estadiamento.

A pressuposição de proporcionalidade dos preditores foi testada com a inclusão de covariáveis dependentes do tempo no modelo escolhido, tanto para recorrência como para sobrevida global. Foi observado que a hipótese de proporcionalidade não foi rejeitada ( $P > 0.05$ ), o que valida a metodologia aplicada ao presente estudo.

Análises de resíduos foram realizadas para verificar a existência de dados discrepantes. Um caso foi descartado com base nos resultados observados, restando 65 casos válidos para inclusão nas análises estatísticas.

As análises estatísticas foram conduzidas com a utilização do programa computacional SAS versão 9.4 para Windows® (SAS® Institute, 2015-2016). Para todos os testes estatísticos aplicados neste estudo, considerou-se rejeição da hipótese nula quando o valor de P foi menor que 0,05.

## 5 RESULTADOS

No total, 65 pacientes foram selecionadas para análise. A idade variou de 24 a 78 anos, com média de 55,55 anos; 20 pacientes (30,77%) apresentaram estágio I ou II e 45 pacientes (69,23%) apresentaram estágio III ou IV de acordo com a classificação da FIGO; 41 pacientes (63,08%) foram submetidas a citorredução ótima e 24 pacientes (36,92%) foram submetidas a citorredução subótima.

Das 65 pacientes selecionadas para estudo, 36 (55,38%) apresentaram baixa expressão de *STAT1* e 29 (44,62%) apresentaram alta expressão de *STAT1*.

No grupo com baixa expressão de *STAT1* (36 pacientes), a idade variou de 24 a 78 anos, com média de 53,81 anos; 9 pacientes (25%) apresentaram estágio I ou II e 27 pacientes (75%) apresentaram estágio III ou IV de acordo com a classificação da FIGO; 20 pacientes (55,56%) foram submetidas a citorredução ótima e 16 pacientes (44,44%) foram submetidas a citorredução subótima.

No grupo com alta expressão de *STAT1* (29 pacientes), a idade variou de 36 a 73 anos, com média de 57,72 anos; 11 pacientes (37,93%) apresentaram estágio I ou II e 18 pacientes (62,07%) apresentaram estágio III ou IV de acordo com a classificação da FIGO; 21 pacientes (72,41%) foram submetidas a citorredução ótima e 8 pacientes (27,59%) foram submetidas a citorredução subótima.

Todas as pacientes foram submetidas a tratamento quimioterápico com composto de platina, a maioria (83,08%, 54 pacientes) associada a paclitaxel.

Os dados clínicos e histopatológicos das 65 pacientes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos das 65 pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau selecionadas para análise.

|  | <b>STAT1 baixa</b> | <b>STAT1 alta</b> | <b>Total</b> |
|--|--------------------|-------------------|--------------|
| <b>Número de pacientes</b>                           | 36 (55,38%)        | 29 (44,62%)       | 65 (100%)    |
| <b>Idade</b>   |                    |                   |              |
| Mínimo   | 24                 | 36                | 24           |
| Máximo   | 78                 | 73                | 78           |
| Média  | 53,81              | 57,72             | 55,55        |
| Mediana  | 54                 | 58                | 56           |
| Desvio-padrão  | 11,54              | 8,39              | 10,37        |
| <b>Estádio FIGO</b>                                  |                    |                   |              |
| I/II   | 9 (25%)            | 11 (37,93%)       | 20 (30,77%)  |
| III/IV   | 27 (75%)           | 18 (62,07%)       | 45 (69,23%)  |
| <b>Doença residual</b>                               |                    |                   |              |
| <1cm   | 20 (55,56%)        | 21 (72,41%)       | 41 (63,08%)  |
| 1-2cm  | 16 (44,44%)        | 08 (27,59%)       | 24 (36,92%)  |
| <b>Tratamento</b>                                    |                    |                   |              |
| Platina <sup>a</sup> + paclitaxel                    | 29 (80,56%)        | 25 (86,20%)       | 54 (83,08%)  |
| Platina <sup>a</sup> + ciclofosfamida                | 2 (5,56%)          | 2 (6,90%)         | 4 (6,15%)    |
| Platina <sup>a</sup> + ciclofosfamida + adriamicina  | 3 (8,32%)          | 0                 | 3 (4,61%)    |
| Platina <sup>a</sup> + agente adicional <sup>b</sup> | 2 (5,56%)          | 0                 | 2 (3,08%)    |
| Carboplatina isolada                                 | 0                  | 2 (6,90%)         | 2 (3,08%)    |

<sup>a</sup> agente utilizado: carboplatina ou cisplatina

<sup>b</sup> agente adicional utilizado: doxorubicina ou docetaxel

Na Tabela 2 estão apresentadas as correlações de Pearson entre os dados clínicos e histopatológicos e expressão de *STAT1*. Observou-se que houve correlação estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre a variável Citorredução e as variáveis Estadiamento, Grau de diferenciação e Intervalo livre de doença e entre as variáveis Sobrevida global e Intervalo livre de doença.

Tabela 2. Correlações de Pearson entre os dados clínicos e histopatológicos e expressão de *STAT1*

|                           | Citorredução | STAT1 | Estadiamento | Idade | Grau de diferenciação | Intervalo livre de doença | Sobrevida global |
|---------------------------|--------------|-------|--------------|-------|-----------------------|---------------------------|------------------|
| Citorredução              | 1,00         | 0,17  | -0,39*       | 0,02  | -0,32*                | 0,26*                     | 0,09             |
| STAT1                     |              | 1,00  | -0,05        | 0,14  | 0,07                  | 0,07                      | 0,02             |
| Estadiamento              |              |       | 1,00         | 0,04  | 0,20                  | -0,23                     | -0,13            |
| Idade                     |              |       |              | 1,00  | -0,07                 | -0,09                     | -0,08            |
| Grau de diferenciação     |              |       |              |       | 1,00                  | -0,9                      | -0,08            |
| Intervalo livre de doença |              |       |              |       |                       | 1,00                      | 0,86*            |
| Sobrevida global          |              |       |              |       |                       |                           | 1,00             |

\*estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ )

Avaliação do intervalo livre de doença nas pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau distribuídas conforme a expressão de *STAT1* está ilustrada na Figura 7. Foi possível observar melhor comportamento da curva de sobrevivência de pacientes com alta expressão de *STAT1* para Intervalo livre de doença, estatisticamente significativo ( $P=0,0256$ ), com base no Log-Rank (Cox-Mantel). Esses resultados indicam que pacientes com alta expressão de *STAT1* tiveram, em média, maior intervalo livre de doença.

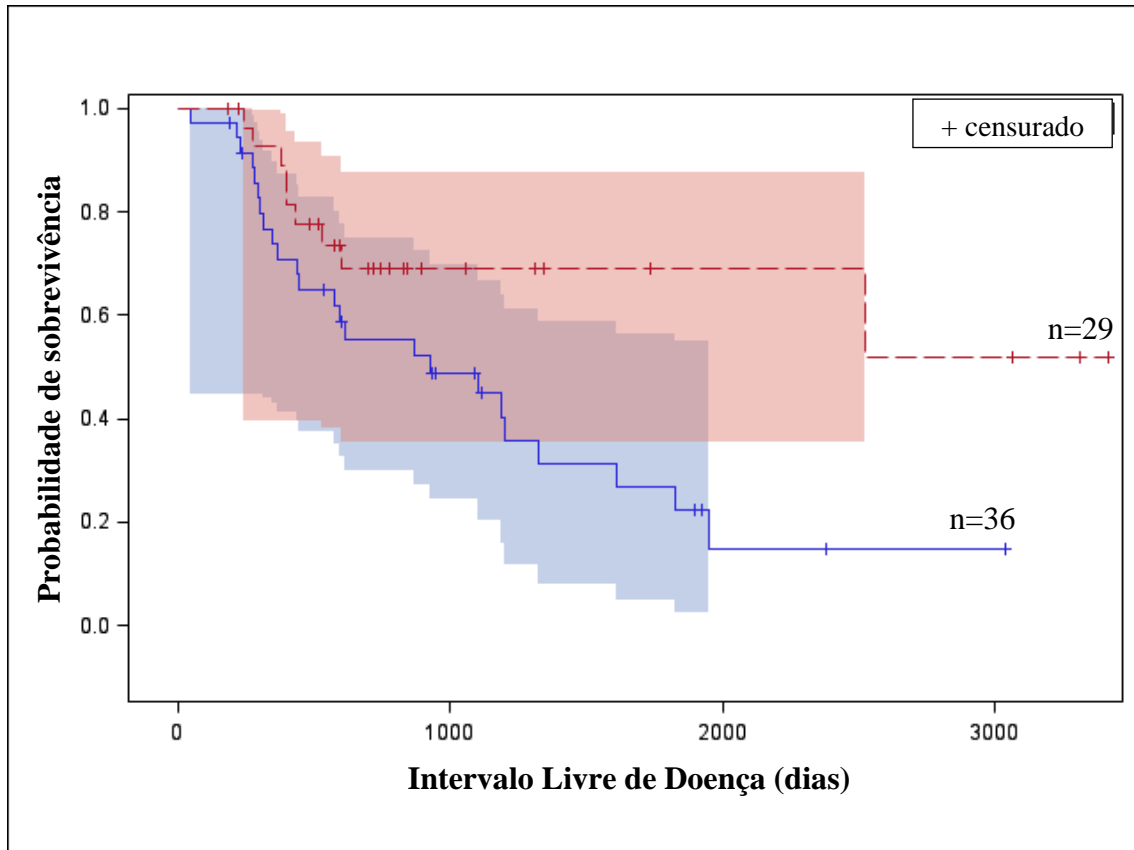


Figura 7 Curvas de sobrevivência para Intervalo Livre de Doença (Kaplan-Meier) das 36 pacientes com baixa expressão de *STAT1* (linha contínua azul) e das 29 pacientes com alta expressão de *STAT1* (linhas tracejada vermelha), (Log-Rank,  $P=0,0256$ ). Intervalo de Confiança = 95% (Hall-Wellner Bands); n: número de pacientes por classe de *STAT1*.

Avaliação da sobrevida global das pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau distribuídas conforme a expressão de *STAT1* está apresentada na Figura 8. Observou-se melhor comportamento da curva de sobrevivência de pacientes com alta expressão de *STAT1* para sobrevida global. As diferenças entre as curvas das pacientes com alta e baixa expressão de *STAT1* foram estatisticamente significativas ( $p=0,0193$ ), com base no Log-Rank (Cox-Mantel).

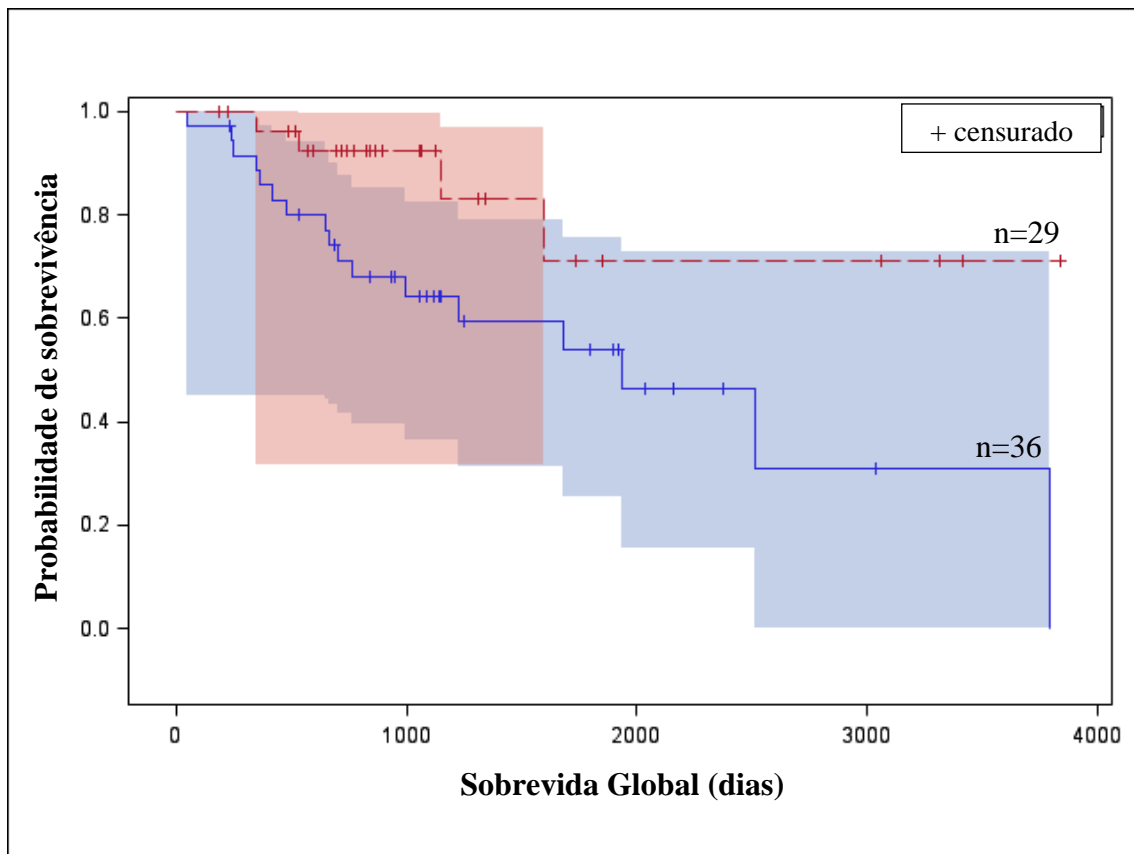


Figura 8 Curvas de sobrevivência para Sobrevida Global (Kaplan-Meier) das 36 pacientes com baixa expressão de STAT1 (linha contínua azul) e das 29 pacientes com alta expressão de STAT1 (linhas tracejada vermelha), (Log-Rank,  $P=0,0193$ ). Intervalo de Confiança=95% (Hall-Wellner Bands); n: número de pacientes por classe de STAT1.

A Tabela 3 mostra o tempo (dias) necessário para que 25% das amostras apresentassem falhas em função da expressão de STAT1 (percentil 25).

Tabela 3. Sobrevivência em função da classe de expressão de STAT1.

| Variável                  | Classe de expressão de STAT1 | Número de dias para atingir 25% de falhas na população |
|---------------------------|------------------------------|--|
| Intervalo Livre de Doença | Alta                         | 529  |
| Intervalo Livre de Doença | Baixa                        | 345  |
| Sobrevida Global          | Alta                         | 1593   |
| Sobrevida Global          | Baixa                        | 665  |

Na Tabela 4 está descrito a frequência de dados censurados e não censurados (falharam) por classe de expressão do STAT1 para Intervalo Livre de Doença e Sobrevida

global. Nota-se desbalanceamento na estrutura dos dados, principalmente se considerados os dados para sobrevida global nas pacientes com alta expressão de *STAT1*, onde existem apenas 4 dados observados e 25 dados censurados.

Tabela 4. Frequência de dados censurados e não censurados (falharam) por classe de expressão de *STAT1* para Intervalo Livre de Doença e Sobrevida global.

| Variável                  | Classe de <i>STAT1</i> | Total | Falharam | Censurados | Percentual de censurados |
|---------------------------|------------------------|-------|----------|------------|--------------------------|
| Intervalo Livre de Doença | Alta                   | 29    | 9        | 20         | 68,97                    |
| Intervalo Livre de Doença | Baixa                  | 37    | 24       | 12         | 33,33                    |
| Sobrevida Global          | Alta                   | 29    | 4        | 25         | 86,21                    |
| Sobrevida Global          | Baixa                  | 37    | 17       | 19         | 52,78                    |

Na Tabela 5 encontram-se os resultados da análise de regressão de risco proporcional de COX para Intervalo Livre de Doença. Foi observado que existe efeito independente estatisticamente significativo ( $P=0,0358$ ) da expressão de *STAT1* no intervalo livre de doença, considerando o efeito das variáveis Estadiamento e Citorredução. A razão de risco observada indica que pacientes com alta expressão de *STAT1* tiveram 43% do risco de recorrência tumoral comparadas às pacientes com baixa expressão de *STAT1* (Tabela 5).

Adicionalmente, foram observados efeitos independentes estatisticamente significativos das variáveis Estadiamento ( $P=0,0222$ ) e Citorredução ( $P=0,0082$ ) no intervalo livre de doença (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados da análise de regressão de risco proporcional de COX para Intervalo Livre de Doença.

| Variável*    | $X^2$ | Valor P | Razão de risco | Intervalo de confiança 95% |       |
|--------------|-------|---------|----------------|----------------------------|-------|
| STAT1        | 4,41  | 0,0358  | 0,432          | 0,198                      | 0,946 |
| Estadiamento | 5,23  | 0,0222  | 1,917          | 1,097                      | 3,350 |
| Citorredução | 6,99  | 0,0082  | 0,373          | 0,179                      | 0,774 |

\*O valor mais baixo foi utilizado como referência para o cálculo da razão de risco.

Os resultados da análise de regressão de risco proporcional de COX para Sobrevida Global estão apresentados na Tabela 6. Foi observada razão de risco para Sobrevida Global de



33%, estatisticamente significativa ( $P=0,0469$ ), favorável às pacientes com alta expressão de *STAT1*, considerando o efeito da variável Estadiamento (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da análise de regressão de risco proporcional de COX para Sobrevida Global

| Variável*    | $X^2$ | Valor P | Razão de risco | Intervalo de confiança 95% |       |
|--------------|-------|---------|----------------|----------------------------|-------|
| STAT1        | 3,95  | 0,0469  | 0,329          | 0,110                      | 0,985 |
| Estadiamento | 7,77  | 0,0053  | 3,290          | 1,424                      | 7,599 |

\*O valor mais baixo foi utilizado como referência para o cálculo da razão de risco.

## 6 DISCUSSÃO

Existem evidências de que a interação entre microambiente imune do hospedeiro e características intrínsecas do tumor contribuem para diferentes desfechos clínicos. Predição de prognóstico a partir do padrão do infiltrado linfocitário peritumoral evidencia o papel da imunoeedição no controle neoplásico. Especificamente, presença de resposta imune Th1, regulada por  $INF\gamma$ , associa-se a melhor prognóstico em vários tipos de neoplasia (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

Vários trabalhos na literatura sugerem que um microambiente reativo está associado a melhor prognóstico nas neoplasias. Zhang e colaboradores (2003), avaliando pacientes com carcinoma de ovário, demonstraram que presença de células T CD3+ intratumorais correlacionou-se a sobrevida livre de doença em média 3,9 vezes maior e sobrevida global em média 2,8 vezes maior do que tumores sem infiltrado imune. Curiel e colaboradores (2004) correlacionaram presença de células T regulatórias com redução de sobrevida no carcinoma de ovário. A presença de linfócitos T intratumorais em tumores primários de ovário e em lesões metastáticas foi correlacionada ao prognóstico por Leffers e colaboradores (2009), sendo presença de linfócitos T citotóxicos ou maior relação entre linfócitos T citotóxicos e regulatórios relacionada a maior sobrevida, o que sugere que não só os tipos de linfócito, mas também seus valores relativos, devem ser levados em consideração. O trabalho de Sato e colaboradores (2005) sugerem que maior número de linfócitos intraepiteliais T CD8+ citotóxicos, assim como menor número de linfócitos T regulatórios, estão associados a melhor prognóstico no câncer epitelial de ovário.

Entretanto, muitas pesquisas envolvem diferentes subtipos de tumor. Considerar o câncer de ovário como doença única é um fator que dificulta a descoberta de biomarcadores neste grupo heterogêneo de tumores, que apresentam comportamentos distintos (BERNS; BOWTELL, 2012; KARST; DRAPKIN, 2010; KURMAN; SHIH, 2010, 2011; VAUGHAN et al., 2011).

Para obter um grupo homogêneo, foram analisadas neste estudo somente as pacientes portadoras de câncer de ovário seroso de alto grau, com amostras do tumor retiradas previamente ao tratamento quimioterápico e que foram submetidas a citorredução primária ótima ou subótima, com posterior quimioterapia a base de platina.

A partir da análise das características clínicas e histopatológicas das pacientes selecionadas (Tabelas 1 e 2) foi observado, com significância estatística ( $P < 0,05$ ), que quanto

melhor foi a citorredução, maior o intervalo livre de doença. Esse dado vai ao encontro de dados da literatura, que apontam a citorredução como fator de bom prognóstico no câncer de ovário (BRISTOW; PURI; CHI, 2009; COLOMBO et al., 2010; FAGOTTI et al., 2006; VERGOTE et al., 2001). Melhor citorredução também foi correlacionada, com significância estatística ( $P < 0,05$ ), a menor estadiamento de acordo com a classificação da FIGO e a menor grau de diferenciação. Ainda, sobrevida global correlacionou-se com significância estatística ( $P < 0,05$ ) a sobrevida livre de doença.

Análise dos dados demonstrou correlação positiva com significância estatística ( $P = 0,0256$ ) entre expressão de *STAT1* e Intervalo livre de doença (Figura 7). Além disso, foi encontrada correlação positiva com significância estatística ( $p = 0,0193$ ) entre expressão de *STAT1* e Sobrevida global (Figura 8).

Portanto, observamos melhor comportamento das curvas de sobrevivência nos tumores com alta expressão de *STAT1* por todo o período estudado (Figuras 7 e 8). Especificamente, a Tabela 3 mostra, considerando as curvas de sobrevivência, o tempo (dias) para atingir 25% de falhas na população em função da classe (baixa ou alta) de expressão do *STAT1*. A escolha da descrição dos dados no percentil 25 foi feita devido a menor frequência dos dados censurados até esse ponto, quando comparada com os percentis 50 e 75. Observou-se que, para amostras com alta expressão de *STAT1*, foram necessários 529 dias para que 25% das pacientes apresentassem recorrência e 1.593 dias para que elas apresentassem fim da sobrevida global. Nos casos com baixa expressão de *STAT1*, foram necessários 345 dias para que 25% das pacientes apresentassem recorrência e 665 dias para que elas apresentassem fim da sobrevida global. Portanto, tumores apresentando alta expressão de *STAT1* tiveram intervalo livre de doença em média 1,53 vezes maior e sobrevida global em média 2,4 vezes maior do que tumores com baixa expressão de *STAT1*, quando analisadas no percentil 25.

Para verificar o efeito isolado de *STAT1* nas curvas de sobrevida, foi realizada análise estatística com aplicação do modelo de regressão de risco proporcional de COX (Tabelas 5 e 6). A partir de seleção pelo método *stepwise*, as variáveis *STAT1*, Estadiamento e Citorredução foram incluídas no modelo para análise de intervalo livre de doença e as variáveis *STAT1* e Estadiamento foram incluídas no modelo para análise de sobrevida global. O efeito independente estatisticamente significativo ( $P = 0,0358$ ) da expressão de *STAT1* no intervalo livre de doença encontrado neste estudo indica que essa proteína pode estar relacionada com aumento do tempo até a recidiva, indiretamente funcionando como marcador de resposta à quimioterapia. Na análise da sobrevida global, observou-se que também existe efeito independente estatisticamente significativo ( $P = 0,0469$ ) da expressão de *STAT1*.

Adicionalmente, foram observados efeitos independentes estatisticamente significativos das variáveis Estadiamento ( $P=0,0222$ ) e Citorredução ( $P=0,0082$ ) no intervalo livre de doença (Tabela 5), e da variável Estadiamento ( $P=0,0053$ ) na sobrevida global, o que está de acordo com dados da literatura (BRISTOW; PURI; CHI, 2009; COLOMBO et al., 2010).

Assim como em nosso trabalho, Koti e colaboradores (2015) compararam comportamento das curvas de sobrevivência e expressão de *STAT1* considerando somente tumores de ovário seroso de alto grau não submetidos previamente à quimioterapia. Os resultados foram compatíveis com os nossos, com maior expressão de *STAT1* relacionada a melhor comportamento das curvas de sobrevivência. Observou-se baixa expressão desta proteína associada de maneira estatisticamente significativa ( $P=0,02$ ) a menor intervalo livre de doença, reforçando a influência da resposta imune Th1 no comportamento do tumor (KOTI et al., 2015). Baixa expressão de *STAT1* também foi relacionada a menor sobrevida global, embora não tenha sido estatisticamente significativo ( $P=0,08$ ) (KOTI et al., 2015). Tais achados reforçam nossos resultados e apontam a *STAT1* como potencial biomarcador no câncer de ovário seroso de alto grau.

É recomendável que os resultados encontrados sejam validados por estudos com maior número de pacientes. Observa-se, devido ao tamanho amostral, desbalanceamento entre os dados observados e censurados na análise estatística (Tabela 4), principalmente para sobrevida global, onde, em pacientes com alta expressão de *STAT1*, verificou-se apenas 4 dados observados e 25 dados censurados (Tabela 4).

Dados da literatura sinalizam para a importância de pesquisas sobre o envolvimento da expressão de *STAT1* com o câncer de ovário, o que reitera a necessidade de validação dos achados.

Experimentos para indução de sarcomas em animais, por exemplo, mostraram que resposta anti-tumoral a partir de células T CD8<sup>+</sup> relacionou-se com presença de proteína *Stat1* (MESSINA et al., 2013), assim como animais com alterações em *Stat1* apresentaram maior susceptibilidade a neoplasia mamária (KOROMILAS; SEXL, 2013). Além disso, estudos de expressão de *STAT1* foram feitos em tecido de tumores humanos (RODRÍGUEZ et al., 2007; LANDOLFO et al., 2000; XI et al., 2006) com maior expressão associada a melhor prognóstico em câncer de mama (ASCIERTO et al., 2012), colorretal (SIMPSON et al., 2010) e pâncreas (SUN et al., 2014).

O papel antitumoral dos interferons pode se dar, entre outros mecanismos, a partir de liberação de células T citotóxicas, células dendríticas e NK (CHAWIA-SARKAR et al.,

2003). Análise do contexto imune, ou seja, localização, densidade e função das populações celulares, tem permitido estudar seus componentes em diversos tipos de tumor e relacionar microambiente e prognóstico (FRIDMAN et al., 2012), possibilitando novos caminhos na busca por marcadores biológicos.

O efeito de células T no desfecho clínico foi alvo de diversos estudos, sumarizados por Fridman e colaboradores (2012). Infiltrado linfocitário mostrou-se associado a melhor curso de doença em melanoma, tumores de mama, bexiga, ovário, próstata, colorretal, neoplasias uroteliais, renais e de cabeça e pescoço, sendo a resposta imune Th1, células T CD3+, T citotóxicas CD8+ e T de memória CD45RO+ consistentemente associadas a maior sobrevida (revisado por FRIDMAN et al., 2012).

O potencial valor de STAT1 como biomarcador fundamenta-se, portanto, através dos resultados da análise do microambiente imune tumoral, já que STAT1 relaciona-se intimamente com as vias relacionadas ao INF.

Apesar dos avanços, mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* permanecem como principais marcadores biológicos para prognóstico e predição de resposta ao tratamento com platina no câncer de ovário (ARTIOLI et al., 2013; DAVID et al., 2002; NELSON, 2015; POTHURI, 2013). David e colaboradores (2002) mostraram maior sobrevida global associada a alterações em *BRCA*, embora tenham sido analisadas somente as três mutações mais frequentemente encontradas em judeus Ashkenazi: *BRCA1-185delAG*, *BRCA1-5382inscC* e *BRCA2-6174delT*. Mulheres com mutações germinativas ou somáticas em *BRCA1* ou *BRCA2* mostram melhor resposta a quimioterapia e maior intervalo livre de doença quando comparadas com pacientes sem essas mutações (BERNS; BOWTELL, 2012).

Disrupções em *BRCA1* e *BRCA2* foram relacionadas a melhor sobrevida em curto prazo em pacientes com câncer epitelial de ovário e especificamente em um grupo composto somente do tipo seroso de alto grau. Entretanto, alterações nesses genes não foram associadas a melhor sobrevida global quando considerado tempo de dez anos (CANDIDO-DOS-REIS et al., 2014).

Pesquisas sobre associação entre mutações e eventos epigenéticos em *BRCA* com infiltrado linfocitário intratumoral têm demonstrado maior frequência de disrupções em *BRCA1* no câncer de ovário que apresenta microambiente reativo, especialmente no tipo seroso de alto grau (CLARKE et al., 2009; GEORGE et al., 2013; NELSON, 2015). Os fatores mediadores do efeito imunológico de *BRCA1* no câncer de ovário não estão claros.

É interessante notar que alterações da função tanto em *BRCA1* quanto em *BRCA2* foram associadas ao fenótipo de sensibilidade ao tratamento quimioterápico no câncer de

ovário (ARTIOLI et al., 2013; PATCH et al., 2015), mas somente as disrupções em *BRCA1* foram associadas a infiltrado linfocitário tumoral (NELSON, 2015). *BRCA1*, além de sua função de reparo no DNA, funciona como fator de transcrição, comportando-se como coativador de *STAT1* (NELSON, 2015; SAHA et al., 2010). Esses achados chamam atenção para possível ligação entre o valor preditivo de resposta do *BRCA1* e expressão de *STAT1*, merecendo consideração neste sentido.

A elaboração de tratamentos com drogas que tenham como alvo o microambiente tumoral poderia modular a resposta imune, aumentando a sensibilidade às drogas quimioterápicas utilizadas para tratamento do câncer de ovário.

Tratamento com imunomoduladores têm sido amplamente estudados. A partir da teoria de imunovigilância tumoral, várias terapias anti-neoplásicas foram propostas (KYI; POSTOW, 2014). Já foi demonstrado indução de resposta imune por vacinas no câncer de ovário, com aumento de células T CD8+, assim como terapias antigênicas passivas têm potencial de desenvolvimento (PRESTON et al., 2011).

A consolidação de biomarcadores será importante tanto para detecção precoce como para elaboração de protocolos de tratamento e melhor delineação do prognóstico (SAWYERS, 2008; NWSHEEN et al., 2012).

Como o infiltrado linfocitário está associado a resposta à quimioterapia em muitos tipos de câncer, análises que possam caracterizar as células imunes no tecido são fundamentais na procura por biomarcadores. Métodos de abordagem digital, com análise objetiva de imagem, podem fornecer características confiáveis sobre histopatologia e microambiente imune tumoral, sendo úteis para identificar marcadores biológicos em tumores sólidos (YUAN, 2014).

Na busca por marcadores biológicos, perfis moleculares foram correlacionados com dados clínicos por Tohill e colaboradores (2008), que observaram prognóstico e infiltrado imune celular distintos relacionados a cada perfil. Estudo de amostras de tumores de ovário seroso foi realizado a partir de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para tentar identificar vias e genes relacionados à resposta à quimioterapia e mostrou, entre outros resultados, um padrão relacionado à sinalização molecular e resposta imune (BOSQUET et al., 2014; THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2011). Perfis moleculares dos tumores serosos pélvicos de alto grau mostram presença de mutações em *TP53* como alteração genética mais prevalente, presente em cerca de 96,7% dos casos. Por isso, *TP53* está provavelmente relacionado com a patogênese destes tumores, mas não serve como biomarcador de prognóstico (AHMED et al., 2010; PATCH et al., 2015). Com objetivo de

desenvolver preditores de desfecho clínico para melhor estratificação das pacientes, foi desenvolvido por Verhaak e colaboradores (2012) um modelo para prognóstico denominado CLOVAR (*Classification of Ovarian Cancer*), a partir da análise do perfil de expressão de tumores de ovário serosos de alto grau. Esse modelo classificou os tumores de ovário serosos de alto grau em quatro subtipos: diferenciados, imunorreativos, mesenquimais e proliferativos (VERHAAK et al., 2012).

Com ajuda de radiogenômica, estudo da correlação entre as alterações genômicas e transcriptômicas com imagens da morfologia dos tumores, Vargas e colaboradores (2015) relacionaram, com significância estatística, presença de infiltrado mesentérico e envolvimento peritoneal na tomografia computadorizada com subtipo mesenquimal, sendo preditivo de pior prognóstico. Os achados reforçam a ideia de que existem distintos subtipos moleculares, o que pode ser fator de confusão na validação de assinaturas gênicas associadas a cada subtipo.

Análise dos perfis de expressão gênica tem reconhecido eventos relacionados a desfecho clínico e resposta à quimioterapia (HARTMANN et al., 2005; JAZAERI, et al., 2005; VERHAAK et al., 2012). Entretanto, ainda não existe biomarcador confiável para prever se a paciente apresenta tumor de ovário resistente ou sensível ao tratamento, sendo os achados insuficientes para aplicação desses estudos na prática clínica (BERNS; BOWTELL, 2012; KOTI et al., 2015; PATCH et al., 2015; SAKAMOTO et al., 2001; SELVANAYAGAM et al., 2004).

O reconhecimento de vias moleculares específicas envolvidas na variação na resposta terapêutica é fundamental para a descoberta de novos marcadores biológicos para o câncer de ovário. *STAT1* apresenta-se como potencial biomarcador de resposta ao tratamento. Apesar das funções anti-tumorais desempenhadas por ele, alguns estudos correlacionaram a expressão de *STAT1* com pior prognóstico e resistência à quimioterapia. Sem dúvida o papel de *STAT1* na tumorigênese é complexo, e investigação mais detalhada de seus mecanismos de atuação são necessárias (MEISSL et al., 2015).

Abordagem longitudinal, ou seja, antes, durante e após o tratamento clínico, pode oferecer metodologia útil na elucidação do papel de *STAT1* na carcinogênese. Estabelecimento de correlação entre genótipo e fenótipo de maneira seriada é proposto por Chin e colaboradores (2015) na plataforma de aprendizagem adaptativa denominada APOLLO, com resultados promissores na identificação de mecanismos relacionados à resistência a quimioterápicos.

Com objetivo de facilitar a aplicação das descobertas genômicas na prática clínica, a abordagem da plataforma APOLLO baseia-se na hipótese de que alterações genéticas menos

frequentes podem ter grande importância do ponto de vista individual, levando em consideração micro e macroambiente, linhagem germinativa e características comportamentais. O estudo de perfis genômicos e sua correlação com dados clínicos para todos os pacientes, e não somente um grupo selecionado, tem potencial para identificar características relacionadas ao desfecho clínico (CHIN et al., 2015).

Resistência adquirida à quimioterapia é um dos grandes problemas no tratamento do câncer. O fato de vários trabalhos correlacionarem maior expressão de *STAT1* com melhor prognóstico e de alguns estudos relacionarem ativação de *STAT1* com resistência ao tratamento (MEISSL et al., 2015) indica que a resposta imune à neoplasia seria melhor avaliada de maneira longitudinal.

Uma possibilidade para explicar o comportamento aparentemente dúbio de *STAT1* é a de que tumores intrinsecamente mais agressivos levariam a maior expressão de *STAT1* pelo hospedeiro, como forma de defesa. Entretanto, essa resposta seria insuficiente para controle do crescimento neoplásico. Analisando o quadro estático, em único momento, poderia parecer que maior expressão de *STAT1* correlaciona-se com pior prognóstico. Avaliação seriada poderia estabelecer a sequência temporal, auxiliando na busca por biomarcadores.

O conhecimento da influência da expressão de *STAT1* no microambiente imune tumoral e na resposta à quimioterapia no câncer de ovário seroso de alto grau pode ser de grande valor. Se consolidado como biomarcador, *STAT1* pode contribuir para desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, com drogas que potencializem a resposta imunológica.



## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou influência da expressão do gene *STAT1* no tumor de ovário a partir da correlação de expressão de *STAT1* com dados de pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau, utilizando análise imunohistoquímica em lâminas de TMA.

Foi observado que maior expressão de *STAT1* correlacionou-se, com significância estatística ( $P=0,0256$ ), com maior intervalo livre de doença,

Maior expressão de *STAT1* também se correlacionou, com significância estatística ( $P=0,0193$ ), com maior sobrevida global.

Portanto, maior expressão de *STAT1* foi associada a melhor comportamento das curvas de sobrevivência, reforçando o papel de *STAT1* como biomarcador preditivo. Este resultado sugere a possibilidade de utilização da via de *STAT1* para o desenvolvimento de novos medicamentos imunomoduladores, que poderiam melhorar a resposta ao tratamento.

Os resultados obtidos suportam fortemente a recomendação de que novos estudos, com maior número de dados, sejam realizados no sentido de validar o papel de *STAT1* na resposta à quimioterapia do câncer seroso de ovário.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, R.; LINCH, M.; KAYE, S. B. Novel therapeutic agents in ovarian cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, vol.32, n.8, p.875-886, 2006.

ARTIOLI, G.; BORGATO, L.; AUSONI, S.; AZZARELLO, G. Ovarian Cancer: BRCA Genetics Reveals Targets for New Therapies. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, vol.5, n.1, p.209-215, 2013.

ASCIERTO, M. L.; KMIĘCIAK, M.; IDOWU, M. O.; MANJILI, R.; ZHAO, Y.; GRIMES, M.; DUMUR, C.; WANG, E.; RAMAKRISHNAN, V.; WANG, X-Y.; BEAR, H. D. A signature of immune function genes associated with recurrence-free survival in breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, vol.131, n.3, p.871-880, 2012.

ASCIERTO, P. A.; CAPONE, M.; URBA, W. J.; BIFULCO, C. B.; BOTTI, G.; LUGLI, A.; MARINCOLA, F. M.; CILIBERTO, G.; GALON, J.; FOX, B. A. The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, 2013.

AHMED, A. A.; ETEMADMOGHADAM, D.; TEMPLE, J.; LYNCH, A. G.; RIAD, M.; SHARMA, R.; STEWART, C.; FEREDAY, S.; CALDAS, C.; deFAZIO, A.; BOWTELL, D.; BRENTON, J. D. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. **The Journal of Pathology**, vol.221, n.1, p.49-56, 2010.

AU, K. K.; JOSAHKIAN, J. A.; SQUIRE, J. A.; KOTI, M. The utility of biomarkers in improving prognosis in ovarian cancer. **Future Oncology**, vol.130, n.11, p.1725-1730, 2015.

BARLIN, J. N.; JELINIC, P.; OLVERA, N.; BOGOMOLNIY, F.; BISOGNA, M.; DAO, F.; BARAKAT, R. R.; CHI, D. S.; LEVINE, D. A. Validated gene targets associated with curatively treated advanced serous ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology**, vol.128, n.3, p.512-517, 2013.

BAXEVANIS; C. N.; PAPAMICHAIL; M.; PEREZ, S. A. Immune classification of colorectal cancer patients: impressive but how complete? **Expert Opinion on Biological Therapy**, vol.13, n.4, p.517-526, 2013.

BERNS, E. M. J. J.; BOWTELL D.D. The Changing View of High-Grade Serous Ovarian Cancer. **Cancer Research**, vol.72, n.11, p.2701-2704, 2012.

BINDEA, G.; MLECNIK, B.; TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; WALDNER, M.; OBENAUF, A. C.; ANGELL, H.; FREDRIKSEN, T.; LAFONTAINE, L.; BERGER, A.; BRUNEVAL, P.; FIDMAN, W. H.; BECKE, C.; PAGÈS, F.; SPEICHE, M. R.; TRAJANOSKI, Z.; GALON, J. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. **Immunity**, vol.39, n.4, p.782-795, 2013.

BONNEAU, C.; ROUZIER, R.; GEYL, C.; CORTEZ, A.; CASTELA, M.; LIS, R.; DARAI, E.; TOUBOUL, C. Predictive markers of chemoresistance in advanced stages epithelial ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology**, vol.136, n.1, p.112-120, 2015.

BOSQUET, J. G.; MARCHION, D. C.; CHON, H.; LANCASTER, J. M.; CHANOCK, S. Analysis of chemotherapeutic response in ovarian cancers using publicly available high-throughput data. **Cancer Research**, vol.74, n.14, p.3902-3912, 2014.

BRISTOW, R. E.; PURI, I.; CHI, D. S. Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis. **Gynecologic Oncology**, vol. 112, n.1, p.265-274, 2009.

BRIVANLOU, A. H.; DARNELL Jr, J. E. Signal transduction and the control of gene expression. **Science**, vol.295, n.5556, p.813-818, 2002.

CANDIDO-DOS-REIS, F. J.; SONG, H.; GOODE, E. L.; CUNNINGHAM, J. M.; FRIDLEY, B. L.; LASON, M. C.; ALSOP, K.; DICKS, E.; HARRINGTON, P.; RAMUS, S. J.; FAZIO, A.; MITCHELL, G.; FEREDAY, S.; BOLTON, K. L.; GOULEY, C.; MICHIE, C.; KALAN, B.; LESTER, J.; WALSH, C.; CASS, I.; OLSSON, H.; GORE, M.; BENITEZ, J. J.; GARCIA, M. J.; ANDRULIS, I.; MULLIGAN, A. M.; GLENDON, G.; BLANCO, I.; LAZARO, C.; WHITTEMORE, A. S.; McGUIRE, V.; SIEH, W.; MONTAGNA, M.; ALDUCCI, E.; SADETZKI, S.; CHETRIT, A.; KWONG, A.; KJAER, S. K.; JENSEN, A.; HOGDALL, E.; NEUHAUSEN, S.; NUSSBAUM, R.; DALY, M.; GREENE, M. H.; MAI, P. L.; LOUD, J. T.; MOYSICH, K.; TOLAND, A. E.; LAMBRECHTS, D.; ELLIS, S.; FROST, D.; BRENTON, J. D.; TISCHKOWITZ, M.; EASTON, D. F.; ANTONIOU, A.; CHENEVIX-TRENCH, G.; GAYTHER, S. A.; BOWTELL, D.; PHAOAH, P. D. P. Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, vol.21, n.3, p.652-657, 2014.

CANNA, K.; McARDLE, P. A.; McMILLAN, D. C.; McNICOL, A.-M.; SMITH, G. W.; McKEE, R. F.; McARDLE, C. S. The relationship between tumour T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, vol.92, n.4, p.651-654, 2005.

CHAWLA-SARKAR, M.; LINDNER, D. J.; LIU, Y.-F.; WILLIAMS, B. R.; SEN, G. C.; SILVERMAN, R. H.; BORDEN, E. C. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, vol.8, n.3, p.237-249, 2003.

CHEN, P.; HUHTINEN, K.; KAIPIO, K.; MIKKONEN, P.; AITTOMÄKI, V.; LINDELL, R.; HYNINEN, J.; AURANEN, A.; GRENNAN, S.; LEHTONEN, R.; CAPÉN, O.; HAUTANIEMI, S. Identification of Prognostic Groups in High Grade Serous Ovarian Cancer Treated with Platinum-Taxane Chemotherapy. **Cancer Research**, vol.75, n.15, p.2987-2998, 2015.

CHENE, G.; LAMBLIN, G.; LE BAIL-CARVAL, K.; CHABERT, P.; BAKRIN, N.; MELLIER, G. Early Preinvasive Lesions in Ovarian Cancer. **BioMed Research International**. Volume 2014, 2014.

CHENE, G.; DAUPLAT, J.; RADOSEVIC-ROBIN, N.; CAYRE, A.; PENAULT-LLORCA, F. Tu-be or not tu-be: That is the question. . . About serous ovarian carcinogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, vol.88, n.1, p.134-143, 2013.

CHIEN, J.; KUANG, R.; LANDEN, C.; SHRIDHAR, V. Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment. **Frontiers in Oncology**, vol.3, 2013.

CHESTER, C.; DORIGO, O.; BEREK, J. S.; KOHRT, H. Immunotherapeutic approaches to ovarian cancer treatment. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, vol.3, 2015.

CHIN, L.; WARGO, J. A.; SPRING, D. J.; KANTARJIAN, H.; FUTREAL, A. Cancer Genomics in Clinical Context. **Trends in Cancer**, vol.1, n.1, p.36-43, 2015.

CLARKE, B.; TINKER, A. V.; LEE, C.-H.; SUBRAMANIAN, S.; van de RIJN, M.; TURBIN, D.; KALLOGER, S.; HAN, G.; CEBALLOS, K.; CADUNGOG, M. G.; HUNTSMAN, D. G.; COUKOS, G.; GILKS, C. B. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type and BRCA1 loss. **Modern Pathology**, vol.22, n.3, p.393-402, 2009.

COOSEMANS, A.; VERGOTE, I.; van GOOL, S. W.; Dendritic cell-based immunotherapy in ovarian cancer. **Oncoimmunology**, vol.2, n.12, 2013.

COFFELT, S. B.; VISSER, K. E. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. **Trends in Immunology**, vol.36, n.4, p.198-216, 2015.

COLOMBO, N.; PEIRETTI, M.; PARMA, G.; LAPRESA, M.; MANCARI, R.; CARINELLI, S.; SESSA, C.; CASTIGLIONE, M. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, vol.21, p.23-30, 2010. Supplement 5.

CURIEL, T. J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P.; EVDEMON-HOGAN, M.; CONEJO-GARCIA, J. R.; ZHANG, L.; BUROW, M.; ZHU, Y.; WEI, S.; KRYCZEK, I.; DANIEL, B.; GODON, A.; MYERS, L.; LACKNER, A.; DISIS, M. L.; KNUTSON, K. L.; CHEN, L.; ZOU, W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature Medicine**, vol.10, n.9, p.942-949, 2004.

DANCEY, J. Targeted therapies and clinical trials in ovarian cancer. **Annals of Oncology**, vol.24, p.59-63, 2013. Supplement 10.

BEN-DAVID, Y.; CHETRIT, A.; HIRSH-YECHEZKEL, G.; FRIEDMAN, E.; BECK, B. D.; BELLER, U.; BEM-BAURUCH, G.; FISHMAN, A.; LEVAVI, H.; LUBIN, F.; MENCZER, J.; PIURA, B.; STRUEWING, J. P.; MODAN, B. Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. **Journal of Clinical Oncology**, vol.20, n.2, p.463-466, 2002.

DAVIS, A.; TINKE, A. V.; FRIEDLANDER, M. "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? **Gynecologic Oncology**, vol.133, n.3, p.624-631, 2014.

DeNARDO, D. G.; BRENNAN, D. J.; REXHEPAJ, E.; RUFFELL, B.; SHIAO, S. L.; MADDEN, S. F.; GALLAGHER, W. M.; WADHAWANI, N.; KEIL, S. D.; JUNAID, S. A.; RUGO, H. S.; HWANG, E. S.; JIRSTRÖM, K.; WEST, B. L.; COUSSENS, L. M. Leucocyte Functionally regulates response to Chemotheapy. **Cancer Discovery**, vol.1, n.1, p.56-67, 2011.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature Reviews. Immunology**, vol.6, n.11, p.836-848, 2006.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, vol.3, n.11, p.991-998, 2002.

FAGOTTI, A.; FERRANDINA, G.; FANFANI, F.; ERCOLI, A.; LORUSSO, D.; ROSSI, M.; SCAMBIA, G. A Laparoscopy-Based Score To Predict Surgical Outcome in Patients With Advanced Ovarian Carcinoma: A Pilot Study. **Annals of Surgical Oncology**, vol.13, n.8, p.1156-1161, 2006.

FODALE, V.; PIEROBON, M.; LIOTTA, L.; PETRICOIN, E. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? **Cancer Journal**, vol.17, n. 2, p.89-95, 2011.

FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews. Cancer**, vol.12, n.4, p.298–306, 2012.

FRIDMAN, W. H.; REMARK, R.; GOC, J.; GIRALDO, N. A.; BECHT, E.; HAMMOND, S. A.; DAMOTTE, D.; DIEU-NOSJEAN, M.-C.; SAUTÈS-FRIDMAN, C. The Immune Microenvironment: A Major Player in Human Cancers. **International Archives of Allergy and Immunology**, vol.164, n.1, p.13-26, 2014.

GALON, J.; COSTES, A.; SANCHEZ-CABO, F.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; LAGORCE-PAGÈS, C.; TOSOLINI, M.; CAMUS, M.; BERGER, A.; WIND, P.; ZINZINDOHOUE, F.; BRUNEVAL, P.; CUGNENC, P. H.; TRAJANOSKI, Z.; FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, vol.313, n.5795, p.1960-1964, 2006.

GALON, J.; ANGELL, H. K.; BEDOGNETTI, D.; MARINCOLA, F. M. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. **Immunity**, vol.39, n.1, p.11-26, 2013.

GALON, J.; MLECNIK, B.; BINDEA, G.; ANGELL, H. K.; BERGER, A.; LAGORCE, C.; LUGLI, A.; ZLOBEC, I.; HARTMANN, A.; BIFULCO, C.; NAGTEGAAL, I. D.; PALMQVIST, R.; MASUCCI, G. V.; BOTTI, G.; TATANGELO, F.; DELRIO, P.; MAIO, M.; LAGHI, L.; GRIZZI, F.; ASSLABER, M.; D'ARRIGO, C.; VIDAL-VANACLOCHA, F.; ZAVADOVA, E.; CHOUCANE, L.; OHASHI, P. S.; HAFEZI-BAKHTIARI, S.; WOUTERS, B. G.; ROEHL, M.; NGUYEN, L.; KAWAKAMI, Y.; HAZAMA, S.; OKUNO, K.; OGINO, S.; GIBBS, P.; WARING, P.; SATO, N.; TORIGOE, T.; ITOH, K.; PATEL, P. S.; SHUKLA, S. N.; WANG, Y.; KOPETZ, S.; SINICROPE, F. A.; SCRIPCARIU, V.; ASCIERTO, P. A.; MARINCOLA, F. M.; FOZ, B. A.; PAGÈS, F. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. **The Journal of Pathology**, vol.232, n.2, p.199-209, 2014.

GEORGE, P. M.; BADIGER, R.; ALAZAWI, W.; FOSTER, G. R.; MITCHELL, J. A. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. **Pharmacology & Therapeutics**, vol.135, n.1, p.43-53, 2012.

GEORGE, J.; ALSOP, K.; ETEMADMOGHADAM, D.; HONDOW, H.; MIKESKA, T.; DOBROVIC, A.; deFAZIO, A.; SMYTH, G. K.; LEVINE, D. A.; MITCHELL, G.; BOWTELL, D. D. Nonequivalent gene expression and copy number alterations in high-grade serous ovarian cancers with BRCA1 and BRCA2 mutations. **Clinical Cancer Research**, vol.19, n.13, p.3474-3484, 2013.

HARTMANN, L. C.; LU, K. H.; LINETTE, G. P.; CLIBY, W. A.; KALLI, K. R.; GERSHENSON, D.; BAST, R. C.; STEC, J.; IARTCHOUK, N.; SMITH, D. I.; ROSS, J. S.;

HOERSCH, S.; SHRIDHAR, V.; LILLIE, J.; KAUFMANN, S. H.; CLARK, E. A.; DAMOKOSH, A. I. Gene Expression Profiles Predict Early Relapse in Ovarian Cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, vol.11, n.6, p.2149-2155, 2005.

HEINTZ, A. P.; ODICINO, F.; MAISONNEUVE, P.; QUINN, M. A.; BENEDET, J. L.; CREASMAN, W. T.; NGAN, H. Y.; PECORELLI, S.; BELLER, U. Carcinoma of the Ovary. FIGO 26<sup>th</sup> Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, vol.95, p.161-192, 2006. Supplement 1.

HERBST, R. S.; SORIA, J. C.; KOWANETZ, M.; FINE, G. D.; HAMID, O.; GORDON, M. S.; SOSMAN, J. A.; McDERMOTT, D. F.; POWDERLY, J. D.; GETTINGER, S. N.; KOHRT, H. E.; HORN, L.; LAWRENCE, D. P.; ROST, S.; LEABMAN, M.; XIAO, Y.; MOKATRIN, A.; KOEPPEN, H.; HEGDE, P. S.; MELLMAN, I.; CHEN, D. S.; HODI, F. S. Predictive correlates of response to the anti-PDL1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, vol.515, n.7528, p.563-567, 2014.

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, vol.13, n.10, p.714-726, 2013.

HWANG, W.-T.; ADAMS, S. F.; TAHIROVIC, E.; HAGEMANN, I. S.; COUKOS, G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. **Gynecologic Oncology**, vol.124, n.2, p.192-198, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Rio de Janeiro, 2016. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em 22 fev. 2016.

ISSA-NUMMER, Y.; DARB-ESFAHANI, S.; LOIBL, S.; KUNZ, G.; NEKLJUDOVA, V.; SCHRADER, I.; SINN, B. V.; ULME, H. U.; KRONENWETT, R.; JUST, M.; KÜHN, T.; DIEBOLD, K.; UNTCH, M.; HOLMS, F.; BLOHMER, J. U.; HABECK, J. O.; DIETEL, M.; OVERKAMP, F.; KRABISCH, P.; von MINCKWITZ, G.; DENKERT, C. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer – a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. **PLoS one**, vol.8, n.12, p.1-7, 2013.

JAYSON, G. C.; KOHN, E. C.; KITCHENER, H. C.; LEDERMANN, J. A. Ovarian cancer. **Lancet**, vol.384, n.9951, p.1376-1388, 2014.

JAZAERI, A. A.; AWTREY, C. S.; CHANDRAMOULI, G. V.; CHUANG, Y. E.; KHAN, J.; SOTIRIOU, C.; APRELIKOVA, O.; YEE, C. J.; ZORN, K. K.; BIRRER, M. J.; BARRET, J.

C; BOYD, J. Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. **Clinical Cancer Research**, vol.11, n.17, p.6300-6310, 2005.

JEMAL, A; SIEGEL, R; XU, J; WARD, E. Cancer Statistics, 2010. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol.60, n.5, p.277-300, 2010.

JIANG, J.; WU, C.; LU, B. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity. *Journal of Translational Medicine*, vol.11, 2013.

JONES, P. M.; DRAPKIN, R. Modeling High-Grade Serous Carcinoma: How Converging Insights into Pathogenesis and Genetics are Driving Better Experimental Platforms. *Frontiers in Oncology*, vol.3, 2013.

KÄRJÄ, V.; AALTOMAA, S.; LIPPONEN, P.; ISOTALO, T.; TALJA, M.; MOKKA, R. Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of PSA-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy. **Anticancer Research**, vol.25, n.6, p.4435-4438, 2005.

KARST, A. M.; DRAPKIN, R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of Oncology*, vol.2010, 2010

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends in Cell Biology*, vol.25, n.4, p.198-213, 2015.

KLINTRUP, K.; MÄKINEN, J. M.; KAUPPILA, S.; VÄRE, P. O.; MELKKO, J.; TUOMINEN, H.; TUPPURAINEN, K.; MÄKELÄ, J.; KARTTUNEN, T. J.; MÄKINEN, M. J. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, vol.41, n.17, p.2645-2654, 2005.

KOROMILAS, A. E.; SEXL, V. The tumor suppressor function of STAT1 in breast cancer. **JAK-STAT**, vol.2, n.2, p.1-5, 2013

KOTI, M.; GOODING, R. J.; NUIN, P.; HASLEHURST, A.; CRANE, C.; WEBERPALS, J.; CHILDS, T.; BRYSON, P.; DHARSEE, M.; EVANS, K.; FEILOTTOR, H. E.; PARK, P. C.; SQUIRE, J. A. Identification of the IGF1/PI3K/NFkB/ERK gene signalling networks associated with chemotherapy resistance and treatment response in high-grade serous epithelial ovarian cancer. **BMC Cancer**, vol.13, n.1, 2013.

KOTI, M.; SIU, A.; CLÉMENT, I.; BIDARIMATH, M.; TURASHVILI, G.; EDWARDS, A.; RAHIMI, K.; MES-MASSON, A.-M.; SQUIRE, J. A. A distinct pre-existing inflammatory



tumour microenvironment is associated with chemotherapy resistance in high-grade serous epithelial ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, vol.112, n.7, p.1215-1222, 2015

Kyi, C.; Postow, M. A. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. **FEBS Letters**, vol.588, n.2, p.368–376, 2014.

KUHN, E.; KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. Ovarian Cancer Is an Imported Disease: Fact or Fiction? **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, vol.1, n.1, p.1-9, 2012

KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. Molecular Pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer. Shifting the paradigm. **Human. Pathology**, vol.42, n.7, p.918-931, 2011.

KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American Journal of Surgical Pathology*, vol.34, n.3, p.433-443, 2010.

LANDÁNYI, A.; KISS, J.; SOMLAI, B.; GILDE, K.; FEJÖS, Z.; MOHOS, A.; GAUDI, I.; TIMÁR, J. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, vol.56, n.9, p.1459-1469, 2007.

LANDOLFO, S.; GUARINI, A.; RIERA, L.; GARIGLIO, M.; GRIBAUDO, G.; CIGNETTI, A.; CORDONE, I.; MONTEFUSCO, E.; MANDELLI, F.; FOA, R. Chronic myeloid leukemia cells resistant to interferon- $\alpha$  lack STAT1 expression. **The Hematology Journal**, vol.1, n.1, p.7-14, 2000.

LEFFERS, N.; GOODEN, M. J. M.; de JONG, R. A.; HOOGEBOOM, B.-N.; ten HOOR, K. A.; HOLLEMA, H.; BOEZEN, H. M.; van der ZEE, A. G. J.; DAEMEN, T.; NIJMAN, H. W. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, vol.58, n.3, p.449-459, 2009.

LIU, S.; LACHAPELLE, J.; LEUNG, S.; GAO, D.; FOULKES, W. D.; NIELSEN, T. O. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal like breast cancer. **Breast Cancer Research**, vol.14, n.2, p.1-14, 2012.

MALPICA, A.; DEEVERS, M. T.; BORDUKA, D. C.; ATKINSON, E. N.; GERSHENSON, D. M.; SILVA, E. G. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. **American Journal of Surgical Pathology**, vol.28, n.4, p.496-504, 2004.

MARCUS, C. S.; MAXWELL, G. L.; DARCY, K. M.; HAMILTON, C. A.; McGUIRE, W. P. Current approaches and challenges in managing and monitoring treatment response in ovarian cancer. **Journal of Cancer**, vol.5, n.1, p.25-30, 2014.

MEADS, M. B.; GATENBY, R. A.; DALTON, W. S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. **Nature Reviews. Cancer**, vol.9, n.9, p.665-674, 2009.

MESSINA, N. L.; BANKS, K. M.; VIDACS, E.; MARTIN, B. P.; LONG, F.; CHRISTIANSEN, A. J.; SMYTH, M. J.; CLARKE, J. P.; JOHNSTONE, R. W. Modulation of antitumour immune responses by intratumoral Stat1 expression. **Immunology and Cell Biology**, vol.91, n.9, p.556-567, 2013.

MEISSL, K.; MACHO-MASCHLER, S.; MÜLLER, M.; STROBL, B. The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. **Citokyne**. In press. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466615300995>>. Acesso em: 12 jan 2016.

MLECNIK, B.; TOSOLINI, M.; CHAROENTONG, P.; KIRILOVSKY, A.; BINDEA, G.; BERGER, A.; CAMUS, M.; GILLARD, M.; BRUNEVAL, P.; FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; TRAJANOSKI, Z.; GALON, J. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. **Gastroenterology**, vol.138, n.4, p.1429-1440, 2010.

MLECNIK, B.; TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; BERGER, A.; BINDEA, G.; MEATCHI, T.; BRUNEVAL, P.; TRAJANOSKI, Z.; FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; GALON, J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. **Journal of Clinical Oncology**, vol.29, n.6, p.610-618, 2011.

MILNE, K.; KOBEL, M.; KALLOGER, S. E.; BARNES, R. O.; GAO, D.; GILKS, C. B.; WATSON, P. H.; NEILSON, B. H. Systematic analysis of immune infiltrates in highgrade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. **PLoS One**, vol.4, n.7, 2009.

NAKANO, O.; SATO, M.; NAITO, Y.; SUKUZU, K.; ORIKASA, S.; AIZAWA, M.; SUZUKI, Y.; SHINTAKU, I.; NAGURA, H.; OHTANI, H. Proliferative Activity of Intratumoral CD8<sup>+</sup> T-Lymphocytes As a Prognostic Factor in Human Renal Cell Carcinoma: Clinicopathologic Demonstration of Antitumor Immunity. **Cancer Research**, vol.61, n.13, p.5132-5136, 2001.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology. Ovarian Cancer [on line]. NCCN Version 2.2015. Disponível em [www.nccn.org](http://www.nccn.org). Acesso em: 17 dez. 2015.

NELSON, B. H. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. **Journal of Immunology**, vol.185, n.9, p.4977-4982, 2010.

NELSON, B. H. New insights into tumor immunity revealed by the unique genetic and genomic aspects of ovarian cancer. **Current Opinion in Immunology**, vol.33, p.93-100, 2015.

NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; PANAYIOTIDIS, M. I.; GEORGAKILAS, A. G. Molecular markers for cancer prognosis and treatment: Have we struck gold? **Cancer Letters**, vol.327, n.1-2, p.142-152, 2012.

OGINO, S.; NOSHO, K.; IRAHARA, N.; MEYERHARDT, J. A.; BABA, Y.; SHIMA, K.; GLICKMAN, J. N.; FERRONE, C. R.; MINO-KENUDSON, M.; TANAKA, N.; DRANOFF, G.; GIOVANNUCCI, E. L.; FUCHS, C. S. Lymphocytic Reaction to Colorectal Cancer Is Associated with Longer Survival, Independent of Lymph Node Count, Microsatellite Instability, and CpG Island Methylator Phenotype. **Clinical Cancer Research**, vol.15, n.20, p.6412-6420, 2009.

PARK, Y. T.; JEONG, J. Y.; LEE, M. J.; KIM, K. I.; KIM, T. H.; KWON, Y. D.; LEE, C.; KIM, O. J.; AN, H. J. MicroRNAs overexpressed in ovarian ALDH1-positive cells are associated with chemoresistance. **Journal of Ovarian Research**, vol.6, n.1, 2013

PATCH, A.-M.; CHRISTIE, E. L.; ETEMADMOGHADAM, D.; GARSEED, D. W.; GEOGE, J.; FEREDAY, S.; NONES, K.; COWIN, P.; ALSOP, K.; BAILEY, P. J.; KASSAHN, K. S.; NEWELL, F.; QUINN, M. C.; KAZAKOFF, S.; QUEK, K.; WILHELM-BENARTZI, C.; CURRY, E.; LEONG, H. S.; HAMILTON, A.; MILESHKIN, L.; AU-YEUNG, G.; KENNEDY, C.; HUNG, J.; CHIEW, Y. E.; HARNETT, P.; FRIEDLANDER, M.; QUINN, M.; PYMAN, J.; CORDNER, S.; O'BRIEN, P.; LEDITSCHKE, J.; YOUNG, G.; STRACHAN, K.; WARING, P.; AZAR, W.; MITCHELL, C.; TRAFICANTE, N.; HENDLEY, J.; THORNE, H.; SHACKLETON, M.; MILLER, D. K.; ARNAU, G. M.; TOTHILL, R. W.; HOLLOWAY, T. P.; SEMPLE, T.; HARLIWONG, I.; NOURSE, C.; NOURBAKSH, E.; MANNING, S.; IDRISOGLU, S.; BRUXNER, T. J.; CHRIST, A. N.; POUDEL, B.; HOLMES, O.; ANDERSON, M.; LEONARD, C.; LONIE, A.; HALL, N.; WOOD, S.; TAYLOR, D. F.; XU, Q.; FINK, J. L.; WADDELL, N.; DRAPKIN, R.; STRONACH, E.; GABRA, H.; BROWN, R.; JEWELL, A.; NAGARAJ, S. H.; MARKHAM, R.; WILSON, P. J.; ELLUL, J.; McNALLY, O.; DOYLE, M. A.; VEDURURU, R.; STEWART, C.; LENGYEL, E.; PEARSON, J. V.; WADDELL, N.; deFAZIO, A.; GRIMMOND, S. M.; BOWTELL, D. D. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. **Nature**, vol.521, n.7553, p.489-494, 2015.

POTHURI, B. BRCA1-and BRCA2-related mutations: therapeutic implications in ovarian cancer. **Annals of Oncology**, vol.24, 2013. Supplement 8.

PRAT, J.; for the FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, vol.124, n.1, p.1-5, 2014.

PRESTON, C. C.; GOODE, E. L.; HARTMANN, L. C.; KALLI, K. R.; KNUTSON, K. L. Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. **Immunotherapy**, vol.3, n.4, p.539-556, 2011.

RAIN CZUK, A.; RAO, J.; GATHERCOLE, J.; STEPHENS, A. N. The emerging role of CXC chemokines in epithelial ovarian cancer. **Reproduction**, vol.144, n.3, p.303-317, 2012.

RAIN CZUK, A.; RAO, J. R.; GATHERCOLE, J. L.; FAIRWEATHER, N. J.; CHU, S.; MASADAH, R.; JOBLING, T. W.; DEB-CHOUDHURY, S.; DYER, J.; STEPHENS, A. N. Evidence for the antagonistic form of CXC-motif chemokine CXCL10 in serous epithelial ovarian tumours. **International Journal of Cancer**, vol.134, n.3, p.530-541, 2014.

RESCIGNO, P.; CERILLO, R.; RUOCCO, R.; CONDELLO, C.; De PLACIDO, S.; PENSABENE, M. New hypothesis on pathogenesis of ovarian cancer lead to future tailored approaches. **BioMed Research International**, vol. 2013, 2013.

RODRÍGUEZ, T.; MÉNDEZ, R.; Del CAMPO, A.; JIMÉNEZ, P.; APTSIAURI, N.; GARRIDO, F.; RUIZ-CABELLO, F. Distinct mechanisms of loss of INF-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. **BMC Cancer**, vol.7:34, p.1-11, 2007.

SAHA, B.; PRASANA, J.; CHANDRASEKAR, B.; NANDI, D. Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon gamma. **Cytokine**, vol.50, n.1, p.1-14, 2009.

SATO, E.; OLSON, S. H.; AHN, J.; BUNDY, B.; NISHIKAWA, H.; QIAN, F.; JUNGBLUTH, A. A.; FROSINA, D.; GNJATIC, S.; AMBROSONE, C.; KEPNER, J.; ODUNSI, T.; RITTER, G.; LELE, S.; CHEN, Y.-T.; OHTANI, H.; OLD, L. J.; ODUNSI, K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+ regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.102, n.51, p.18538-18543, 2005.

SAUNDERS, N. A., SIMPSON, F.; THOMPSON, E. W.; HILL, M. M.; ENDO-MUNOZ, L.; LEGGATT, G.; MINCHIN, R. F.; GUMINSKI, A. Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. **EMBO Molecular Medicine**, vol. 8, n.4, p.675-684, 2012.

SAKAMOTO, M.; KONDO, A.; KAWASAKI, K.; GOTO, T.; SAKAMOTO, H.; MIYAKE, K.; KOYAMATSU, Y.; AKIYA, T.; IWABUCHI, H.; MUROYA, T.; OCHIAI, K.; TANAKA, T.; KIKUCHI, Y.; TENJIN, Y. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. **Human Cell**, vol.14, n.4, p.305-315, 2001.

SELVANAYAGAM, Z. E.; CHEUNG, T. H.; WEI, N.; VITTAL, R.; LO, K. W.; YEO, W.; KITA, T.; RAVATN, R.; CHUNG, T. K.; WONG, Y. F; CHIN, K.V.; Prediction of chemotherapeutic response in ovarian cancer with DNA microarray expression profiling. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, vol.154, n.1, p.63-66, 2004.

SOUSA, C. B. **Implicações clínico-patológicas da AKT fosforilada em carcinoma de ovário**. 2013. 73f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. **The Journal Clinical investigation**, vol.117, n.5, p.1137–1146, 2007.

SAWYERS, C. L. The cancer biomarker problem. **Nature**, vol.452, n.7187, p.548–552, 2008.

SHIAO, S. L.; GANESAN, A. P.; RUGO, H. S.; COUSSENS, L. M. Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. **Genes & Development**, vol.25, n.24, p.2559-2572, 2011.

SHIH, I.-M.; KURMAN, R. J. Ovarian Tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. **The American Journal of Pathology**, vol.164, n.5, p.1511-1518, 2004.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, vol.331, n.6024, p.1565-1570, 2011.

SCHUMACHER, K.; HAENSCH, W.; RÖEFZAAD, C.; SCHLAG, P. M. Prognostic Significance of Activated CD81 T Cell Infiltrations within Esophageal Carcinomas. **Cancer Research**, vol.61, n.10, p.3932–3936, 2001.

SIMPSON, J. A.; AL-ATTAR, A.; WATSON, N. F.; SCHOLEFIELD, J. H.; LLYAS, M.; DURRANT, L. G. Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. **Gut**, vol.59, n.7, p.926-933, 2010.

STARK, G. R.; DARNELL, J. E. JR. The JAK-STAT pathway at twenty. **Immunity**, vol.36, n.4, p.503-514, 2012.

SUN, Y.; YANG, S.; SUN, N.; CHEN, J. Differential expression of STAT1 and p21 proteins predicts pancreatic cancer progression and prognosis. **Pancreas**, vol.43, n.4, p.619-623, 2014.

TENG, M. W.; NGIOW, S. F.; RIBAS, A.; SMYTH, M. J. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. **Cancer Research**, vol.75, n.11, p.2439-2145, 2015.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK (TCGA). Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. **Nature**, vol.474, n.7353, p.609-615, 2011.

TOMAO, F.; LO RUSSO, G.; SPINELLI, G. P.; STATI, V.; PRETE, A. A.; PRINZI, N.; SINJARI, M.; VICI, P.; PAPA, A.; CHIOTTI, M. S.; PANICI, P. B.; TOMAO, S. Fertility drugs, reproductive strategies and ovarian cancer risk. **Journal of Ovarian Research**, vol.7, 2014.

TOTHILL, R. W.; TINKER, A. V.; GEORGE, J.; BROWN, R.; FOX, S. B.; LADE, S.; JOHNSON, D. S.; TRIVETT, M. K.; ETEMADMOGHADAM, D.; LOCANDRO, B.; TRAFICANTE, N.; FEREDAY, S.; HUNG, J. A.; CHIEW, Y. E.; HAVIV, I.; AUSTRALIAN OVARIAN CANCER STUDY GROUP; GERTIG, D.; DEFAZIO, A.; BOWTELL, D. D. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. **Clinical Cancer Research**, vol.14, n.16, p.5198-5208, 2008.

USHIJIMA, K. Treatment for recurrent ovarian cancer-at first relapse. **Journal of Oncology**, vol.2010, 2010.

VARGAS, H. A.; MICCÒ, M.; HONG, S. I.; GOLDMAN, D. A.; DAO, F.; WEIGELT, B.; SOSLOW, R. A.; HRICAK, H.; LEVINE, D. A.; SALA, E. Association between Morphologic CT Imaging Traits and Prognostically Relevant Gene Signatures in Women with High-Grade Serous Ovarian: A Hypothesis-generating Study. **Radiology**, vol.274, n.3, p.742-751, 2015.

VAUGHAN, S.; COWARD, J. I.; BAST, R. C. JR.; BERCHUCK, A.; BEREK, J. S.; BRENTON, J. D.; COUKOS, G.; CRUM, C. C.; DRAPKIN, R.; ETEMADMOGHADAM, D.; FRIEDLANDER, M.; GABRA, H.; KAYE, S. B.; LORD, C. J.; LENGYEL, E.; LEVINE, D. A.; MCNEISH, I. A.; MENON, U.; MILLS, G. B.; NEPHEW, K. P.; OZA, A. M.; SOOD, A. K.; STRONACH, E. A.; WALCZAK, H.; BOWTELL, D. D.; BALKWILL, F. R. Rethinking Ovarian Cancer: Recommendations for Improving Outcomes. **Nature Reviews Cancer**, vol.11, n.10, p.719-725, 2011.

VANG, R.; SHIH, I.-M.; KURMAN, R. J. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. **Advances in Anatomic Pathology**, vol.16, n.5, p.267-282, 2009.

VERHAAK R. G.; TAMAYO, P.; YANG, J. Y.; HUBBARD, D.; ZHANG, H.; CREIGHTON, C.J.; FEREDAY, S.; LAWRENCE, M.; CARTER, S. L.; MERMEL, C. H.; KOSTIC, A. D.; ETEMADMOGHADAM, D.; SAKSENA, G.; CIBULSKIS, K.; DURAISAMY, S.; LEVANON, K.; SOUGNEZ, C.; TSHERNIAK, A.; GOMEZ, S.; ONOFRIO, R.; GABRIEL, S.; CHIN, L.; ZHANG, N.; SPELLMAN, P. T.; ZHANG, Y.; AKBANI, R.; HOADLEY, K. A.; KAHN, A.; KÖBEL, M.; HUNTSMAN, D.; SOSLOW, R. A.; DEFAZIO, A.; BIRRER, M. J.; GRAY, J. W.; WEINSTEIN, J. N.; BOWTELL, D. D.; DRAPKIN, R.; MESIROV, J. P.; GETZ, G.; LEVINE, D. A.; MEYERSON, M. Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. **The Journal of Clinical Investigation**, vol.123, n.1, p.517-525, 2013.

VERGOTE, I.; DE BRABANTER, J.; FYLES, A.; BERTELSEN, K.; EINHORN, N.; SEVELDA, P.; GORE, M. E.; KAERN, J.; VERRELST, H.; SJÖVALL, K.; TIMMERMAN, D.; VANDEWALLE, J.; van GRAMBEREN, M.; TROPÉ, C. G. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. **Lancet**, vol.357, n.9251, p.176-182, 2001.

XI, S.; DYER, K. F.; KIMAK, M.; ZHANG, Q.; GOODING, W. E.; CHAILLET, J. R.; CHAI, R. L.; FERRELL, R. E.; ZAMBONI, B.; HUNT, J.; GRANDIS, J. R. Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, vol.98, n.3, p.181-189, 2006.

WEBERPALS J. I.; KOTI M.; SQUIRE, J. A. Targeting genetic and epigenetic alterations in the treatment of serous ovarian cancer. **Cancer Genetics**, vol.4, n.10, p.525-535, 2011.

WOLF, D.; WOLF, A. M.; RUMPOLD, H.; FIEGL, H.; ZEIMET, A. G.; MULLER-HOLZER, E.; DEIBL, M.; GASTL, G.; GUNSILIUS, E.; MARTH, C. The Expression of the Regulatory TCell Specific Forkhead Box Transcription Factor FoxP3 is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer. **Clinical Cancer Research**, vol.11, n.23, p.8326-8331, 2005.

YUAN, Y. Modelling the spatial heterogeneity and molecular correlates of lymphocytic infiltration in triple-negative breast cancer. **Journal of the Royal Society, Interface/the Royal Society**, vol.12, n.103, 2015.

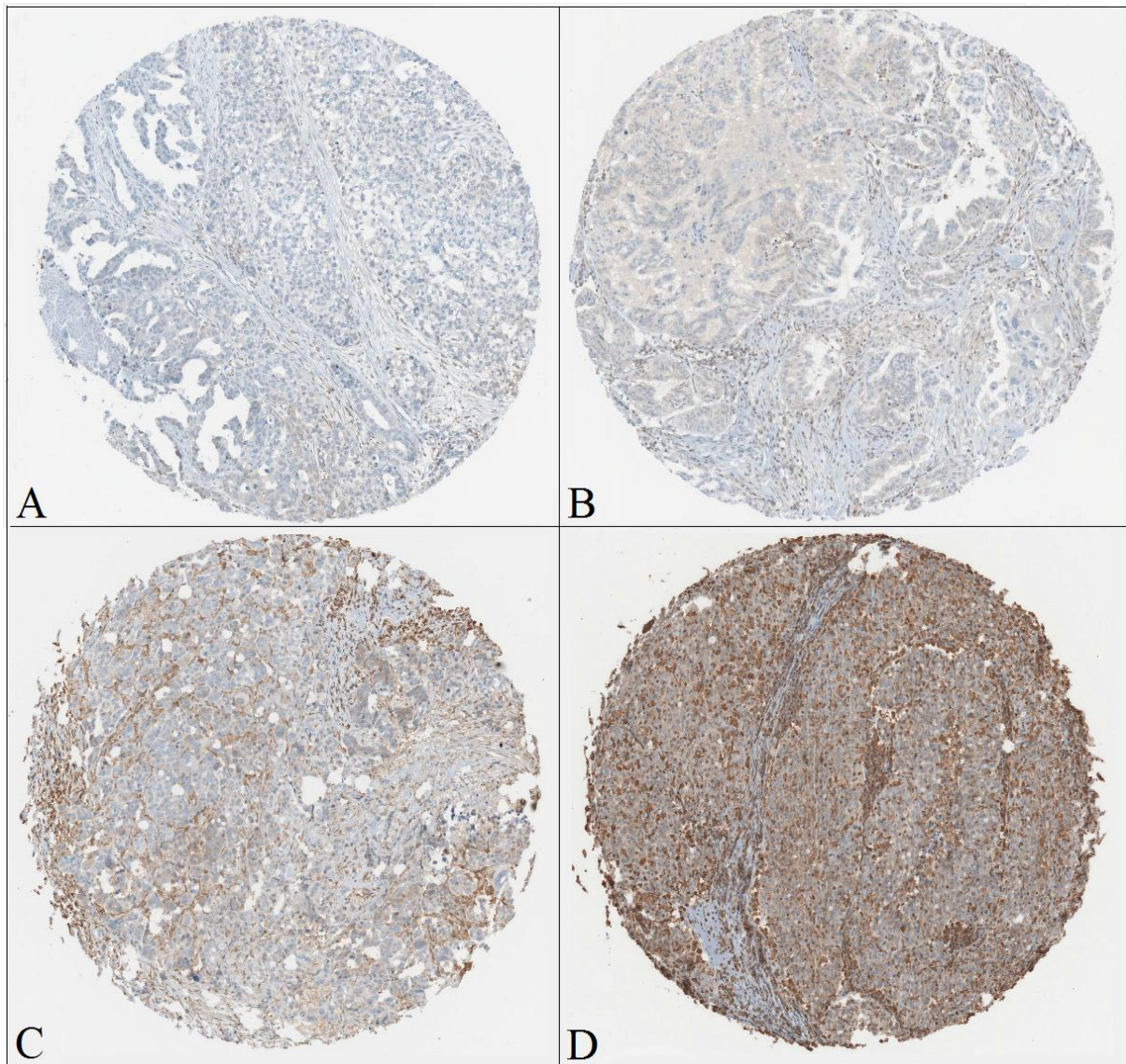
ZHANG, L.; CONEJO-GARCIA, J. R., KATSAROS, D.; GIMOTTY, P. A.; MASSOBRIO, M.; REGNANI, G.; MAKRIGIANNAKIS, A.; GRAY, H.; SCHLIENGER, K.; LIEBMAN, M. N.; RUBIN, S. C.; COUKOS, G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **The New England Journal of Medicine**, vol.348, n.3, p.203-213, 2003.

ZLOBEC, I.; TERRACIANO, L. M.; LUGLI, A. Local recurrence in mismatch repair-proficient colon cancer predicted by an infiltrative tumor border and lack of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. **Clinical Cancer Research**, vol.14, n.12, p.3792-3797, 2008.



## APÊNDICE

Imagens da imunohistoquímica das lâminas de microarranjo tecidual ilustrando as classificações para expressão de *STAT1* nas amostras de tecido tumoral de quatro pacientes com câncer de ovário seroso de alto grau do presente estudo.



(A) amostra de tecido classificada como 0 – negativo; (B) amostra de tecido classificada como 1 – expressão fraca; (C) amostra de tecido classificada como 2 – expressão moderada; (D) amostra de tecido classificada como 3 – expressão forte.

## ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 11 de novembro de 2015

Ofício nº 4014/2015  
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO TUMORAL NA RESPOSTA AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NO CÂNCER DE OVÁRIO SEROSO DE ALTO GRAU" - versão 2, de 15/08/2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 417ª Reunião Ordinária realizada em 09/11/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 7549/2015.

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.*

*Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.*

Atenciosamente.

**DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**

Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores  
**JULIANA ALVES JOSAHKIAN**  
**PROF.DR.JEREMY ANDREW SQUIRE(Orientador)**  
Depto. de Genética - FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Campus Universitário - Monte Alegre  
14048-900 - Ribeirão Preto - SP  
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP  
PWA-00002733; IRB-00002106 e Registro PBCONEP nº 3442  
(16)3822-2228/cep@hcrp.usp.br

[www.hcrp.usp.br](http://www.hcrp.usp.br)