



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José
Alencar Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

NOME DA AUTORA: MICHELLE MARQUES LESSA TORRES

Título da tese: Mutações do gene EGFR e expressão de PD-L1 em tumores de pacientes com câncer do colo do útero

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Claudio Santos Thuler
Prof. Dr. Carlos Gil Moreira Ferreira

RIO DE JANEIRO
2018



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José
Alencar Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

NOME DA AUTORA: MICHELLE MARQUES LESSA TORRES

Título da tese: Mutações do gene EGFR e expressão de PD-L1 em tumores de pacientes com câncer do colo do útero

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia.

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Claudio Santos Thuler
Prof. Dr. Carlos Gil Moreira FerreirA

RIO DE JANEIRO
2018



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José
Alencar Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA
Pós-Graduação em Oncologia**

AUTOR: Michelle Marques Lessa Torres

**Mutação do gene EGFR e expressão de PD-L1 em tumores de pacientes com
câncer do colo do útero**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Dr. Luiz Claudio Santos Thuler
Prof. Dr. Dr. Carlos Gil Moreira Ferreira

Aprovada em: 06 / 02 / 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome – João Paulo de Biaso Viola
Prof. Dr. Nome – Angelica Nogueira Rodrigues
Prof. Dr. Nome – Antônio Rodrigues Braga Neto
Prof. Dr. Nome – Luis Felipe Ribeiro Pinto
Prof. Dr. Nome – Leila Maria Cardao Chimelli
Prof. Dr. Nome – Liz Maria de Almeida

**RIO DE JANEIRO
2018**

T693m Torres, Michelle Marques Lessa

Mutação do gene EGFR e expressão de PD-L1 em tumores de pacientes com câncer do colo do útero/ Michelle Marques Lessa Torres. – Rio de Janeiro, 2018. xix, 166f.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientador: Luiz Claudio Santos Thuler
Co-orientadora: Carlos Gil Moreira Ferreira

1. Neoplasia do colo do útero. 2. Genes erbB-1. 3. EGFR. 4. Terapia-alvo. I. Thuler, Luiz Claudio Santos (Orient.). II. Ferreira, Carlos Gil Moreira Ferreira (Co-orient.). I. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. II. Título.

CDD: 616.994



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José
Alencar Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação**

**Mutação do gene EGFR e expressão de PD-L1 em tumores de pacientes com
câncer do colo do útero**

Resumo

Michelle Marques Lessa Torres

Introdução: O câncer do colo do útero (CC) é a quarta malignidade mais diagnosticada na população feminina mundialmente. A terapia-alvo tem revolucionado o tratamento do câncer tendo como objetivo atingir focalmente as células malignas com menor efeito colateral para o paciente e com resultados promissores. A terapia-alvo para o CC é limitada ao bevacizumabe. Duas proteínas - EGFR e PD-L1 - são possíveis alvos; medicações específicas para elas estão disponíveis no mercado e trazendo benefícios em outros cânceres. Os receptores EGF são expressos pelo CC e, quando ativados, favorecem o crescimento celular maligno, mas terapias anti-EGFR apresentaram resultados controversos. Sugere-se que a sua mutação, como em outras neoplasias, seja necessária para a resposta terapêutica, porém dados do estado mutacional de EGFR diferem na literatura. Além disso, o eixo regulatório PD-1/PD-L1 emergiu como um novo alvo promissor para a terapêutica contra o câncer, mas não há informações consistentes no CC. Em razão da alta mortalidade do CC avançado, a identificação de uma população específica que se beneficiaria da terapia-alvo é de extrema importância. **Objetivos:** Investigar as mutações de EGFR e o padrão de expressão e heterogeneidade de PD-L1 no CC e avaliar o seu significado prognóstico nesses pacientes. **Material e Métodos:** Avaliou-se uma coorte dos casos de CC, do ano de 2011, do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, para mutação de EGFR e expressão de PD-L1. Amostras de DNA foram isoladas a partir de fragmentos fixados em formalina e em parafina. Utilizou-se a análise de sequência direta dos produtos da reação em cadeia da polimerase do gene EGFR para avaliar mutações ativadoras. Avaliou-se a expressão de PD-L1 por meio de imuno-histoquímica em arranjo em matriz de amostras teciduais dos mesmos casos de CC. Foram coletados dados epidemiológicos. **Resultados:** Foram incluídos 184 pacientes com CC nos estágios IA a IV, com idade entre 18-80 anos. Investigaram-se os éxons 18, 19, 20 e 21 de EGFR e a mutação foi encontrada em um (0,78%) de 128 casos de CCE. Nenhum CCA apresentou EGFR mutado. A mutação ocorreu no éxon 18 por uma substituição do glutamato por glutamina na posição 711 (E711Q ou c.2131G>C). Quanto à expressão de PD-L1, houve positividade em 60,2% dos CCE e 37,5% dos CCA. Encontrou-se elevada divergência de expressão de PD-L1 entre amostras do mesmo paciente, 20,0% no CCE e 50,0% no CCA. A expressão de PD-L1 não está associada com a sobrevida no CC. **Conclusão:** Resultados apresentados indicam que as mutações EGFR são incomuns no CC e é improvável que sejam úteis na indicação do tratamento. A expressão de PD-L1 pode ser considerada um potencial biomarcador para CC, contudo a sua heterogeneidade é expressiva e deve ser minuciosamente avaliada em cada paciente.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer José
Alencar Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação

EGFR mutation and PD-L1 expression in patients with cervical cancer

Abstract

Michelle Marques Lessa Torres

Introduction: Cervical cancer (CC) represents the fourth most commonly diagnosed cancer in women worldwide. Although preventive strategies are cardinal, early diagnosis and an effective treatment are primordial for the reduction of morbidity and mortality. Molecular targeted therapy has revolutionized the treatment of cancer as it aims the malignant cells with promising results and fewer side effects than traditional chemotherapy. Although target therapy for CC is precarious, two proteins, EGFR and PD-L1, are possible molecular targets. There is already specific medication against these two proteins available in the market and bringing benefits to other cancers. When EGF receptors are activated it triggers malignant cell growth, and although they are expressed by CC cells, anti-EGFR therapies have shown controversial results. It is suggested that ECFR mutation would be necessary for therapeutic, but data from mutational state of EGFR is contradictory in the literature. In addition, the PD-1 / PD-L1 regulatory axis emerged as a promising new target for cancer therapy, with long-term responses observed in cancers, with no consistent information on CC. Because of the high mortality of advanced CC, the identification of a specific population that would benefit from molecular targeted therapy is extremely important. **Aims:** To investigate EGFR mutations and PD-L1 expression and heterogeneity in CC and to evaluate their prognostic significance in these patients. **Material and methods:** A cohort of CC cases from the National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva was evaluated for EGFR mutation and PD-L1 expression. DNA samples were isolated from formalin-fixed paraffin fragments. Direct sequence analysis of the polymerase chain reaction products of the EGFR gene was used to evaluate activated mutations. The expression of PD-L1 was evaluated by immunohistochemistry in tissue microarray from the same cases of CC. Epidemiological data were collected. **Results:** We included 184 patients with CC from IA to IV, aged 18-80. EGFR exons 18, 19, 20 and 21 were investigated and the mutation was found in one (0.78%) of the 128 cases of CCE. No CCA had mutated EGFR. The mutation occurred in exon 18 by a substitution of amino acid glutamate with glutamine at position 711 (E711Q or c.2131G> C). Regarding the expression of PD-L1, there was positivity in 60.2% of CCE and 37.5% of CCA. Disparity of PD-L1 expression was found between samples from the same patient, 20.0% CCE and 50.0% CCA had discrepancy within patient staining. The expression of PD-L1 was not associated with survival. **Conclusion:** The presented data indicates that EGFR mutations are uncommon in CC and unlikely to be useful for treatment. PD-L1 expression can be considered as a potential biomarker for CC, yet its heterogeneity is significant and should be thoroughly evaluated in each patient.

AGRADECIMENTOS

Ao final dessa jornada, o que mais tenho no coração é gratidão. Gratidão pelas instituições que passei e pelas pessoas que encontrei.

Agradeço aos meus orientadores, Luiz Thuler e Carlos Gil que me incentivaram, ensinaram e mostraram o caminho.

Agradeço aos amigos da pesquisa clínica, em especial Haynna, Débora e Elizangela, que tiveram grande paciência em me ensinar e ouviram muitas vezes “você poderia me ajudar rapidinho?”.

Agradeço aos colaboradores, em especial Priscila Valverde, Thais Abreu e Andreia Melo, que com muito carinho me ajudaram nessa caminhada.

Aos amigos pelo carinho e amizade, por me incentivarem e por estarem sempre do meu lado.

Agradeço em especial aos meu pais e irmãos que me ensinaram a buscar o meu próprio caminho, a lutar pelos meus sonhos e a fazer o que amo.

Agradeço em especial ao meu marido, que passou e sofreu cada dificuldade comigo, que ao longo da jornada acreditou mais em mim do que eu mesma, que me ofereceu suporte incondicional, que teve enorme paciência e que entendeu as minhas ausências.

Agradeço a Deus por me fortalecer a cada manhã e por me proporcionar esse momento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1: Características demográficas e epidemiológicas dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma.....	44
Tabela 6.2: Características clínicas e do tumor dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma.....	45
Tabela 6.3: Características moleculares dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma.....	48
Tabela 6.4: Características da expressão de PD-L1 dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1: Sequência de <i>primers</i> e temperatura de anelamento utilizados nos éxon 18, 19, 20 e 21.	35
Quadro 6.1: Casos de CCE que apresentaram amostras negativa e positiva para expressão de PD-L1.....	53
Quadro 6.2: Casos de CCA que apresentaram amostras negativa e positiva para expressão de PD-L1.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Comparação de incidência e mortalidade de câncer na população feminina entre regiões mais e menos desenvolvidas mundialmente no ano de 2012	4
Figura 2.2: Incidência mundial dos casos de câncer do colo do útero em 2012	4
Figura 2.3: Tendências da incidência de câncer do colo do útero em países selecionados: taxa padronizada por idade por 100 mil	5
Figura 2.4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2017 na população feminina, exceto pele não melanoma	6
Figura 2.5: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer do colo do útero por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2017, segundo Unidade da Federação	7
Figura 2.6: Interação das proteínas E do HPV com o ciclo celular	9
Figura 2.7: Mecanismo de atuação de E7 no ciclo celular	9
Figura 2.8: Atividade intracelular do receptor de EGFR	19
Figura 2.9: PD-1 e câncer: a ligação de células T PD-1 pelo tumor B7-H1 resulta na desregulação de funções efectoras de células T que destroem o tecido tumoral; B: o bloqueio dessa via por anticorpos anti-PD-1 previne a desregulação, e permite que as células T mantenham a sua funcionalidade antitumoral e a capacidade de mediar a morte das células tumorais	24
Figura 5.1: Delineamento do estudo	29
Figura 5.2: Fluxograma de perda de pacientes	31
Figura 6.1: Foto da TMA de PD-L1 demonstrando a classificação de intensidade da coloração na IHQ no CCE	51
Figura 6.2: Foto da TMA de PD-L1 demonstrando a classificação de intensidade da coloração na IHQ no CCA	52
Figura 6.3: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses por categoria de expressão de PD-L1 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo escamoso	57
Figura 6.4: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses pela classificação de Reddy et al, 2017 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo escamoso	58
Figura 6.5: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses por categoria de expressão de PD-L1 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma	59

Figura 6.6: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses pela classificação de Reddy et al, 2017 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma.....60

LISTA DE ABREVIACÕES

- ARPC – Área Representativa de Pesquisa Clínica
- ASCO – Do inglês, American Society of Clinical Oncology
- B7-CD28 – Do inglês, *receptor B7 and cluster of differentiation 28*
- B7-H1 – Do inglês, *B7 homolog 1*
- CAAE – Certificado de apresentação para apreciação ética
- CC – Câncer do colo do útero
- CCA – Câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma
- CCE – Câncer do colo do útero do tipo escamoso
- CCO – Citologia cervical oncótica
- CD80 – Do inglês, *cluster of differentiation 80*
- CDK – Do inglês, *cyclin-dependent kinases*
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- CID – Classificação Estatística Internacional de Doenças
- CTLA-4 – Do inglês, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*
- DNA – Do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*
- DP – Desvio-padrão
- E1 – Região codificadora “precoce” do genoma do HPV. Do inglês, *early*
- E2 – Região codificadora “precoce” do genoma do HPV. Do inglês, *early*
- E4 – Região codificadora “precoce” do genoma do HPV. Do inglês, *early*
- E5 – Região codificadora “precoce” do genoma do HPV. Do inglês, *early*
- E6 – Região codificadora “precoce” do genoma do HPV. Do inglês, *early*
- E7 – Região codificadora “precoce” do genoma do HPV. Do inglês, *early*
- EGFR – *Receptor do fator de crescimento epidérmico*
- eCRF – Ficha de coleta de dados eletrônica
- ErbB-1 – Do inglês, *epidermal growth factor receptor 1*
- ErbB-2 – Do inglês, *epidermal growth factor receptor 2*
- ErbB-3 – Do inglês, *epidermal growth factor receptor 3*
- ErbB-4 – Do inglês, *epidermal growth factor receptor 4*
- ERK – Via quinase regulada por sinal extracelular
- F – Do inglês, *forward*
- FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

G1 – Do inglês, *gap 1*

HER-2 – Do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*

HIV – Do inglês, *human immunodeficiency virus*

HPV – Do inglês, *human papilloma virus*

HR – Do inglês, *hazard ratio*

IC – Intervalo de confiança

IDH – Índice de desenvolvimento humano

IHQ – Imuno-histoquímica

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

L1 – Região codificadora “tardia” do genoma do HPV. Do inglês, *late*

L2 – Região codificadora “tardia” do genoma do HPV. Do inglês, *late*

LCR – Região longa de controle. Do inglês, *long control region*

MAPK – Do inglês, *mitogen-activated protein kinases RAS-RAF*

mTOR – Do inglês, *mammalian target of rapamycin*

NIC – Neoplasia intraepitelial cervical

NKT – Do inglês, *natural killer T*

p16 – Proteína reguladora do ciclo celular

p53 – Proteína supressora tumoral

PCR – Do inglês, *polymerase chain reaction*

PD-1 – Do inglês, *programmed death 1*

PD-L1 – Do inglês, *programmed death-ligant 1*

PI3-K – Do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*

PMN – Polimorfonucleares

R – Do inglês, *reverse*

Rb – Do inglês, *retinoblastoma protein*

RR – Risco relativo

SG – Sobrevida global

STROBE – Do inglês, *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*

SUS – Sistema Único de Saúde

TMA – Do inglês, *tissue microarray*

VEGF – Do inglês, *vascular endothelial growth factor*

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Câncer do colo do útero no mundo	3
2.2 Câncer do colo do útero no Brasil	5
2.3 A infecção pelo HPV e o câncer no colo do útero	7
2.4 O HPV e as lesões pré malignas	10
2.5 Prevenção do câncer do colo do útero	11
2.5.1 Prevenção primária do câncer do colo do útero	11
2.5.2 Prevenção secundária do câncer do colo do útero	12
2.6 Padrão histológico do câncer do colo do útero	13
2.7 Tratamento nos diferentes estágios do câncer do colo do útero	14
2.8 Possíveis alvos terapêuticos no câncer do colo do útero	18
2.8.1 O receptor EGF e o seu papel na carcinogênese	18
2.8.2 O papel da proteína PD-L1 na carcinogênese	21
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo principal	27
4.2 Objetivos secundários	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 População-alvo	28
5.2 Delineamento do estudo (Figura 5.1)	29
5.3 Critérios de inclusão e exclusão de pacientes	29
5.4 Perdas de pacientes	31
5.5 Revisão histopatológica	31
5.6 Variáveis coletadas	32
5.6.1 Variáveis histopatológicas avaliadas e coletadas	32
5.6.2 Variáveis coletadas na revisão de prontuário	32
5.6.2.1 Autodeclaração do paciente	32
5.6.2.2 Avaliação por profissionais que atenderam às pacientes	33
5.7 Extração do DNA para sequenciamento do gene EGFR	33
5.8 Quantificação e análise da qualidade dos ácidos nucléicos para sequenciamento do gene EGFR	34
5.9 Amplificação do DNA e sequenciamento do EGFR	34
5.10 Montagem do arranjo em matriz de amostras teciduais	36
5.11 Imuno-histoquímica para PD-L1	36
5.12 Avaliação da expressão e intensidade de PD-L1	37
5.13 Coleta de dados clínicos	38
5.14 Análise estatística	38

5.15 STROBE <i>checklist</i>	40
6 RESULTADOS	40
6.1 Características demográficas e epidemiológicas (Tabela 6.1) e clínicas e do tumor (Tabela 6.2	41
6.1.1 Características demográficas, epidemiológicas, clínicas e do tumor nos casos de CCE ...	41
6.1.2 Características demográficas, epidemiológicas, clínicas e do tumor nos casos de CCA. ..	42
6.1.3 Comparação entre CCE e CCA	43
6.2 Características morfológicas (Tabela 6.3).....	46
6.2.1 Características morfológicas no CCE	46
6.2.2 Características morfológicas no CCA	47
6.2.3 Comparação das características moleculares dos casos de CCE e CCA	48
6.3 Mutação de EGFR.....	49
6.4 Expressão e intensidade de PD-L1 (Tabela 6.4).....	49
6.4.1 Características da expressão e PD-L1 em CCE.....	52
6.4.2 Características da expressão e PD-L1 em CCA.....	54
6.4.3 Comparação da expressão de PD-L1 nos casos de CCE e CCA	55
6.5 Sobrevida global em cinco anos	55
6.5.1 Avaliação de sobrevida nos casos de CCE	55
6.5.2 Avaliação de sobrevida nos casos de CCA	55
6.5.3 Curvas de Kaplan Meier	56
7 DISCUSSÃO	61
7.1 EGFR.....	61
7.2 Polimorfismos no EGFR.....	63
7.3 PD-L1 no câncer do colo do útero	64
7.4 Expressão de PD-L1	64
7.5 Intensidades da expressão do PD-L1	65
7.6 Heterogeneidade.....	66
7.7 Fisiopatologias do HPV e PD-L1.....	68
7.8 PD-L1 e desfecho.....	69
7.9 PD-L1 e terapia-alvo	70
8 CONCLUSÃO	75
9 REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE A – Telas do sistema do registro de dados eletrônicos	91
APÊNDICE B – Sequenciamento do EGFR.....	92
APÊNDICE C – STROBE Statement - Checklist of items that should be included in reports of cohort studies.....	94
APÊNDICE D – Tabelas Estatísticas	
Tabela D.1: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo escamoso, de acordo com variáveis epidemiológicas e clínicas	97

Tabela D.2: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo escamoso, de acordo com variáveis morfológicas.....	99
Tabela D.3: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida, de acordo com das variáveis epidemiológicas e clínicas do câncer do colo do útero do tipo escamoso	101
Tabela D.4: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida, de acordo com as variáveis morfológicas em câncer do colo do útero do tipo escamoso.....	103
Tabela D.5: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma, de acordo com variáveis epidemiológicas e clínicas.....	105
Tabela D.6: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma, de acordo com variáveis morfológicas	107
Tabela D.7: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida: avaliação das variáveis epidemiológicas e clínica no câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma	109
Tabela D.8: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida de acordo com variáveis morfológicas em câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma	111
ANEXO A – Ficha de aprovação no CEP	113

1 INTRODUÇÃO

O tema que inspirou e motivou esse trabalho é o tratamento eficaz e personalizado contra o câncer do colo do útero (CC). O CC é um problema social que atinge principalmente os países com economia de baixo e médio rendimento e, quanto mais conhecimento e recursos se obtenham para o seu tratamento, maior será o impacto positivo populacional.

O câncer é um problema de saúde pública e as terapias tradicionais, como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, ainda são os principais tratamentos, mas a sua eficácia é insatisfatória na maior parte dos cânceres, especialmente nos cânceres avançados, e seus efeitos colaterais indesejáveis são elevados, afetando a qualidade de vida dos pacientes. Recentemente, surgiram vários tratamentos novos que são chamados terapia-alvo, que tem como objetivo atacar as células cancerígenas específicas, poupando as células saudáveis. A inibição do ponto de controle (*checkpoint*) imune é uma das terapias mais promissoras.

No geral, o avanço do tratamento do câncer se deve ao avanço tecnológico que trouxe, além do conhecimento genômico dessas malignidades, maior clareza com relação às alterações moleculares e às possibilidades de desenvolver terapias-alvo. O artigo clássico sobre as características do processo de malignidade (HANAHAN; WEINBERG, 2011) explora amplamente todos os fatores conhecidos no processo da carcinogênese e traz luz à percepção de que o mecanismo do desenvolvimento do câncer é universal e similar nos diversos tipos de malignidade. Obviamente, cada tipo de neoplasia tem componentes únicos, mas o entendimento profundo sobre uma malignidade pode servir de base para compreender as outras. Este trabalho se utilizou de conhecimento prévio de carcinogênese de outros tumores que aqui foram, de forma única, extrapolados para o CC.

A presente pesquisa envolveu elementos de duas grandes áreas descritas no artigo de Hanahan e Weinberg (2011), mutação e evasão do sistema imune. Com relação à mutação, investigou-se uma possível modificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que poderá induzir uma proliferação celular constante; e, no âmbito da evasão do sistema imune, observou-se a expressão da proteína ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), do inglês *programmed death-ligant 1*, nas células tumorais, que favorece o escape da célula cancerígena do nosso

sistema imune. A importância dessa informação vai para além de um conhecimento estático, é de suma relevância pelo fato de a terapia-alvo contra essas proteínas já estar disponível no mercado e sendo utilizada em outros tipos de câncer.

A escolha dessas duas proteínas é decorrente do seu grande destaque em alguns cânceres e de uma possível utilização dessa descoberta no CC. Há informação sobre a mutação do EGFR e a utilização da sua terapia-alvo usada estabelecidamente nos cânceres de pulmão e de estômago; mas a presença de mutação do EGFR no CC é controversa na literatura. Da mesma forma, tem-se a informação sobre o *status* do PD-L1 e o tratamento estabelecido e em teste com terapias anti-PD-L1 nos cânceres de pulmão, renal, melanoma, neoplasia trofoblástica gestacional, entre outros, mas informação sobre o seu papel no CC não está estabelecido. Alguns estudos preliminares abordaram esse assunto indicando um controverso resultado na mutação do EGFR e uma possível expressão do PD-L1 nas células tumorais no CC e vislumbrou-se a possibilidade de explorar esse assunto de forma abrangente e consistente na população de CC aqui estudada.

O presente estudo busca verificar a presença de mutação do EGFR na população de CC e sua consequência para esse possível subgrupo. Além disso, espera-se aumentar o entendimento do microambiente tumoral em pacientes com CC por meio da análise da expressão da proteína PD-L1 nas células tumorais por imunohistoquímica (IHQ) e da avaliação da possível relação dessa expressão com desfecho. Este estudo visa a fornecer mais informação sobre a mutação do EGFR e a expressão do PD-L1 no CC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer do colo do útero no mundo

Mundialmente, o CC é a malignidade ginecológica com maior incidência e mortalidade em números absolutos. Entre as mulheres, é o quarto tipo de câncer mais diagnosticado e o quarto que mais leva a óbito, ficando atrás apenas dos cânceres de mama, pulmão e colorretal (GLOBOCAN, 2012). No ano de 2012, foram 527.624 mil casos novos de CC no mundo e 265.672 mortes decorrentes dele, representando 8,0% de todas as malignidades que acometeram a população feminina. A sua incidência é maior em países de baixo e médio rendimento e está diretamente ligada a uma política de prevenção ineficaz (Figuras 2.1 e 2.2). No mundo, a incidência (por 100 mil), comparando taxas padronizadas por idade, chega a variar de 1,0 até 46,5; sendo em média 8,0 nos países com maior índice de desenvolvimento humano (IDH) e 25,7 nos países com menor IDH (GLOBOCAN, 2012); esses valores demonstram uma enorme diferença entre países com maior e menor disponibilidade financeira para aplicar em uma política de saúde eficaz. Esse dado enfatiza o fato de os casos de CC serem, em grande parte, consequências de uma precária atenção à saúde básica; a influência das ações preventivas no CC é de extrema valia e indiscutível. A mortalidade, que no CC está diretamente ligada ao diagnóstico precoce, segue o mesmo perfil populacional da incidência. Com isso, os casos de CC acabam sendo diagnosticados em estágios mais avançados e em maior número nos países com baixo e médio rendimento, levando a um desfecho predominantemente desfavorável. Os sintomas correlacionados ao CC inicial podem ser inexistentes, mínimos ou inespecíficos (leucorréia, sinusorragia, dor pévica), sintomas mais significativos normalmente só ocorrem em doença avançada e esse é mais um fator pelo qual as políticas de prevenção são imprescindíveis para o diagnóstico precoce (WALTER, MWAKA, NEAL, 2014). A mortalidade (por 100 mil), comparando taxas padronizadas por idade, nas regiões de menor IDH, é de 16,6; enquanto, nas de maior IDH, é de 2,7. Apesar de a incidência e a mortalidade ainda serem elevadas mundialmente, elas vêm diminuindo nos últimos 30 anos (Figura 2.3) e isso se deu principalmente pelas estratégias de prevenção em diversos níveis.

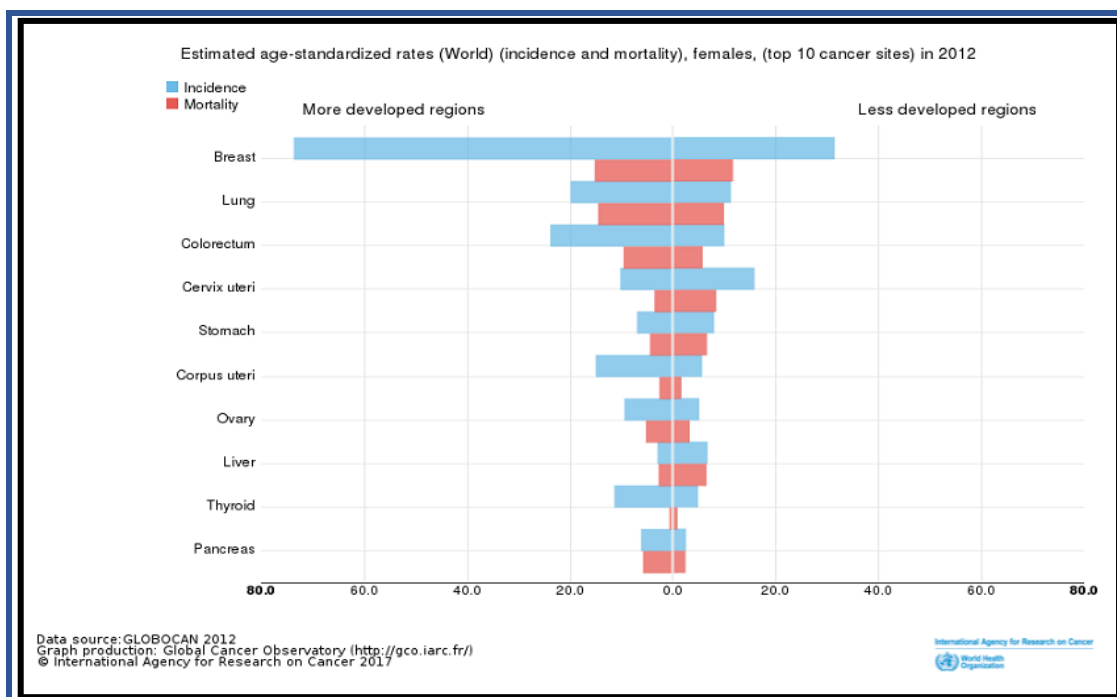


Figura 2.1: Comparação de incidência e mortalidade de câncer na população feminina entre regiões mais e menos desenvolvidas mundialmente no ano de 2012.

Fonte: GLOBOCAN, 2012.

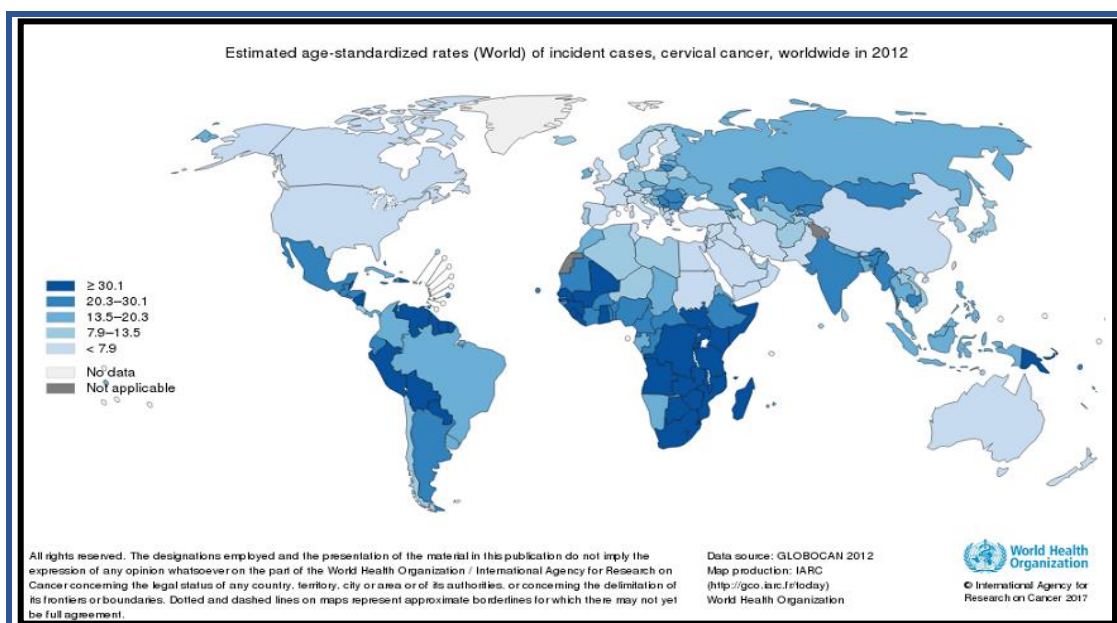


Figura 2.2: Incidência mundial dos casos de câncer do colo do útero em 2012.

Fonte: GLOBOCAN, 2012.

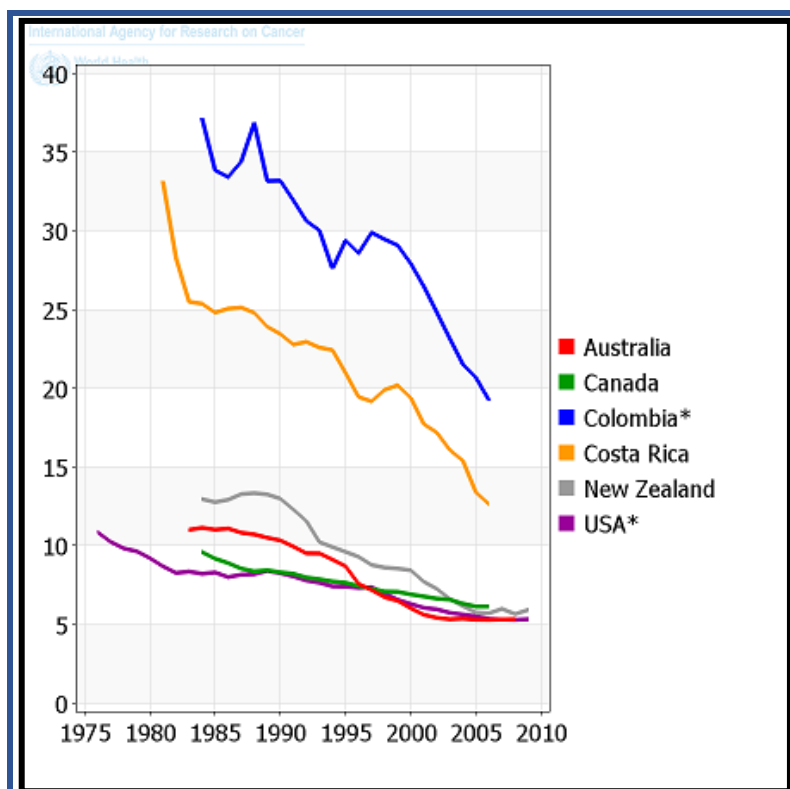


Figura 2.3: Tendências da incidência de câncer do colo do útero em países selecionados: taxa padronizada por idade por 100mil. Fonte: GLOBOCAN, 2012.

2.2 Câncer do colo do útero no Brasil

A realidade no Brasil reflete a realidade mundial com relação à mortalidade, é o quarto tipo de malignidade que mais mata, ficando atrás apenas dos cânceres de mama, pulmão e colorretal, sendo o câncer ginecológico, em números absolutos, que mais leva a óbito em nosso país, por conta da elevada incidência. No que diz respeito à incidência (Figura 2.4), o CC ocupa o terceiro lugar, atrás apenas dos cânceres de mama e colorretal. Para o ano de 2017, estimaram-se 16.340 novos casos e 5.430 mortes decorrentes do CC no Brasil (INCA, 2015). Entre 2000-2009, no Brasil, 23,7% dos casos de CC foram diagnosticados no estágio I, 29,8% no estágio II, 39,5% no estágio III e 7,0% no estágio IV (THULER, AGUIAR, BERGMANN, 2014). Avaliando-se a incidência pelas regiões (INCA, 2015), o CC é o mais incidente na Região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta posição (Figura 2.5), o que possibilita perceber que a incidência no Brasil também está relacionada ao desenvolvimento regional.

Esse resultado está de acordo com o dado apresentado por Oliveira et al. (2015), tendo a Região Norte a maior incidência e a Região Sul a menor. Esses dados sugerem que mesmo no Brasil a incidência do CC também está relacionada a fatores socioeconômicos, assim como no mundo.

Em quinze anos, o número de mortes por CC em relação ao número de mulheres teve uma leve queda no país, passando de 6,65 casos para cada 100 mil mulheres em 2004-2008 para 5,96 casos em 2011-2015 (INCA, 2015). Em números absolutos, no entanto, o número de mortes aumentou, já que a população também cresceu nesse período. Em 2002, a doença matou 4.091 mulheres e, em 2017, 5.430 (INCA, 2015).

Nos anos 1990, houve um esforço político para a implementação e o aumento dos números, e a abrangência dos exames de prevenção em todo país (OLIVEIRA et al., 2015), o que vem trazendo benefícios a longo prazo para a população brasileira. Espera-se que, com a introdução da vacina contra o papilomavírus humano (HPV, do inglês *human papilloma virus*), no calendário vacinal a partir de 2013, as taxas de lesões pré-malignas e malignas diminuam, assim como já vem ocorrendo em outros países como a Austrália, Estados Unidos, Dinamarca e Reino Unido (LEE; GARLAND, 2017). Essas medidas de prevenção são de suma importância, mas vale ressaltar que o acesso ao tratamento, em tempo favorável, de mulheres que tiveram diagnóstico pré-maligno ou maligno, é imprescindível para a diminuição da incidência e da mortalidade do CC.


		Localização primária	casos novos	%
Mulheres 		Mama Feminina	57.960	28,1%
		Cólon e Reto	17.620	8,6%
		Colo do Útero	16.340	7,9%
		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
		Estômago	7.600	3,7%
		Corpo do Útero	6.950	3,4%
		Ovário	6.150	3,0%
		Glândula Tireoide	5.870	2,9%
		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 2.4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2017 na população feminina, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2015.

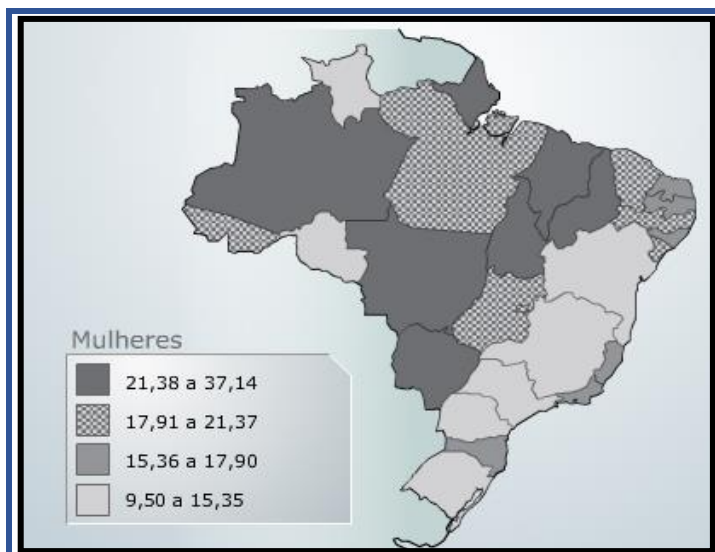


Figura 2.5: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer do colo do útero por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2017, segundo Unidade da Federação.

Fonte: INCA, 2015.

2.3 A infecção pelo HPV e o câncer no colo do útero

O desenvolvimento e a progressão do CC estão diretamente relacionados à infecção pelo HPV. O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, na qual mais de 150 tipos já foram descritos. Entre eles, aproximadamente 40 tipos estão associados a infecções do trato anogenital e podem causar patologias benignas (ex.: verrugas genitais) e o CC. O HPV pode ser dividido em dois grandes grupos, o de baixo e o de alto grau, nos quais o de alto grau é considerado fator de risco e desempenha um papel importante na patogênese do carcinoma cervical. Quinze subtipos foram considerados carcinogênicos: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (BURD, 2003).

O HPV inicia sua atividade nas células do colo do útero após a sua infecção primária por meio da camada basal da junção escamocolunar. O HPV possui pelo menos seis genes que se expressam precocemente e são chamados de *early* (E) e dois tardiamente, chamados de *late* (L). A região E, expressa logo após a infecção, codifica as proteínas envolvidas na indução e na regulação da síntese de DNA (*deoxyribonucleic acid*) e é formada pelos genes E1 associado à replicação viral; E2 associado à transcrição e à replicação; E4 associado à maturação viral e à alteração da matriz intracelular; E5, E6 e E7 envolvidos na transformação celular. A região L,

expressa em estágios posteriores da infecção, codifica as proteínas do capsídeo icosaédrico viral e é formada pelos genes L1 e L2. A proteína L1 é expressa após a L2 no ciclo de replicação viral e faz a mediação na montagem dos vírions de HPV. Entre as regiões E e L, localiza-se a região longa de controle (LCR), uma sequência entre o fim de L1 e o começo de E6 que não codifica proteína, mas mantém o controle da transcrição do vírus, importante no controle da replicação viral e na transcrição de genes virais e celulares (GENTHER et al., 2003).

A proteína E5 é muito importante na fase precoce da infecção, pois estimula o crescimento das células por meio da formação de complexos com o EGFR, o receptor do fator de crescimento β , derivado de plaquetas e com o receptor do fator 1 estimulador de colônias, além de prevenir a apoptose dessas células. Com a integração do DNA viral à célula do hospedeiro, parte da sequência que codifica o E5 é interrompida, o que faz com que o mesmo não participe de eventos tardios da carcinogênese (HWANG; NOTTOLI; DIMAIO, 1995; ZHANG; SPANDA; ROMAN, 2002).

As proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 de HPV de alto risco causam degradação e/ou inativação das proteínas p53 e Rb (*retinoblastoma protein*) (Figura 2.6). A proteína p53 (proteína supressora tumoral) é parte da via de reparo do DNA, podendo levar a uma interrupção do ciclo celular na fase G1 (*gap 1*) e induzir a apoptose. Já a proteína Rb é supressora de tumor e sua forma ativa é quando ela está ligada ao E2F, formando o complexo pRb/E2F (Figura 2.7). O E7, ao se ligar com alta afinidade à pRb, libera o E2F que atua como fator de transcrição no núcleo. O inibidor de CDK (*ciclin-dependent kinases*) p16 INK4a é controlado negativamente por proteínas Rb e, por isso, é superexpresso em células de carcinoma cervical nas quais as proteínas Rb são inativadas por oncoproteínas HPV E7 (YIM; PARK, 2005).

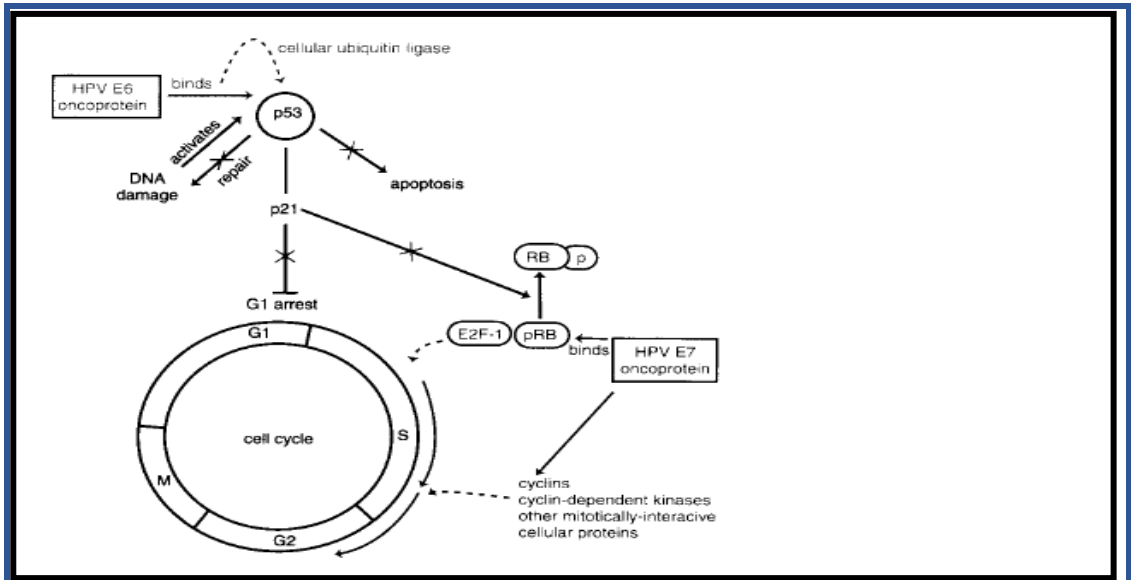


Figura 2.6: Interação das proteínas E do HPV com o ciclo celular.
 Fonte: BURD, 2003.

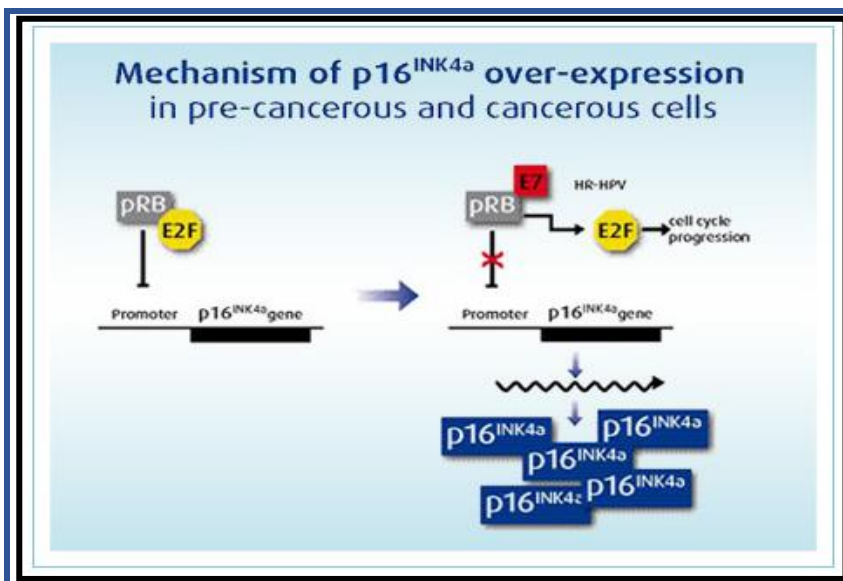


Figura 2.7: Mecanismo de atuação de E7 no ciclo celular.
 Fonte: PER UNA VITA COME PRIMA, 2010.

2.4 O HPV e as lesões pré-malignas

O CC é caracterizado por uma fase pré-maligna bem definida que pode ser suspeitada no exame citológico de células cervicais esfoliadas e confirmada no exame histológico de material cervical. Essas alterações pré-malignas representam um espectro de anormalidades citológicas que variam de NIC (neoplasia intraepitelial cervical) 1 (displasia leve) a NIC 2 (displasia moderada) até NIC 3 (displasia severa/carcinoma *in situ*). Estima-se que oitenta por cento dos indivíduos sexualmente ativos são infectados com HPV em algum momento de sua vida sexual (CHESSON et al, 2014). As infecções por HPV geralmente são transitórias, e mesmo aquelas que persistem por alguns meses geralmente são eliminadas naturalmente após um a dois anos. O desenvolvimento do NIC e do CC é quase sempre precedido por uma infecção por HPV oncogênico e persistente (HILDESHEIM et al., 1994; KOSHIOL et al., 2008). Numerosos determinantes são levados em conta para afetar a progressão da infecção por HPV para NIC, incluindo determinantes comportamentais, como exposição ao tabaco, relações sexuais com elevado número de parceiros, uso de anticoncepcionais e gravidez anterior (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2006, 2007, 2009), bem como imunossupressão e presença de infecções por outros patógenos de transmissão sexual, como *Chlamydia trachomatis* e herpes-vírus simples (SMITH et al., 2002a; 2002b; CHATURVEDI et al., 2009). A NIC é diagnosticada a partir de análise citológica de células da cérvix por meio do exame de Papanicolaou, o que torna oportuno agir na lesão inicial antes da progressão e do desenvolvimento do CC.

As sequências de DNA do HPV são detectáveis na grande maioria dos carcinomas cervicais invasivos, mas a relevância prognóstica de genótipos específicos ainda está para ser completamente definida; na literatura, encontram-se informações controversas. De Cremoux et al. (2009) descobriram que o tipo de HPV foi um preditor independente de sobrevida livre de doença em 515 pacientes. Alguns trabalhos relataram que o genótipo HPV-18 é uma variável prognóstica fraca, mas independente em mulheres com doença precoce tratada com cirurgia primária (BURGER, 1996; KANG, 2011). Por exemplo, Schwartz et al. (2001) observaram que os cânceres relacionados ao HPV-18 tinham um risco duas vezes maior de morte

quando comparados com os cânceres relacionados ao HPV-16. As associações de HPV-18 foram ainda mais fortes para a doença precoce, enquanto nenhuma associação foi observada para doença avançada. Esses resultados permaneceram inalterados nas análises restritas ao CCE (câncer do colo do útero epidermóide). Inversamente, Pilch et al. (2001) descobriram que o genótipo HPV 16 teve um impacto negativo independente na sobrevida global (SG) em 204 pacientes com câncer cervical (risco relativo [RR] = 3,653; $p < 0,002$). O HPV de alto grau é fundamental na carcinogênese, mas a real influência do tipo do HPV é incerta.

Pelo fato de a história natural do CC ser longa (5-10 anos) (GRAVITT; WINER, 2017), há diversas oportunidades para agir e evitar a persistência da infecção e o desenvolvimento que leva ao câncer.

2.5 Prevenção do câncer do colo do útero

A prevenção primária do CC se dá através da diminuição do risco de contrair o HPV e a prevenção secundária é realizada através de medidas de diagnóstico de lesões pré-malignas. As medidas preventivas são de suma importância para diminuir os números de casos de CC e um tratamento eficaz é essencial para a diminuição da morbimortalidade relacionada a essa doença. Apesar de esse câncer específico já possuir estratégias de prevenção estabelecidas e ter tratamento sem alta complexidade para estágios iniciais, é dificilmente tratável em estágios avançados e sua recorrência é frequente.

2.5.1 Prevenção primária do câncer do colo do útero

Dentre as medidas de prevenção primária estão o uso de preservativo e a vacina contra o HPV. Como virtualmente 100% dos CC são decorrentes da infecção persistente do HPV, diminuir o risco de contágio é uma medida de suma importância.

O uso do preservativo é indispensável para conter a disseminação do HPV, mas infelizmente apenas aproximadamente 30% da população brasileira relata usar o preservativo de forma consistente (DOURADO et al., 2015).

A vacina contra o HPV foi introduzida no calendário de vacinação no Sistema Único de Saúde (SUS), em 2013 para meninas e em 2017 para meninos. Apesar do

uso da vacina contra o HPV, o seu papel na mudança do perfil epidemiológico da doença demorará a acontecer por conta da história natural do CC. Apesar de ainda não se terem resultados sobre a diminuição de lesões pré-malignas na população brasileira, mundialmente já se registram resultados promissores após a implementação maciça da vacinação. A não verificação desses resultados no Brasil se deve principalmente a dois fatores, o primeiro é o tempo entre a política de vacinação e o tempo necessário para estimar o benefício da mesma, já que o CC tem uma história natural longa necessitando de aproximadamente de 5-10 anos para observar resultados. Além disso, dados sobre a política de vacinação no Brasil relatam baixa adesão principalmente no segundo ano de disponibilidade da vacina no SUS, ocorrendo uma queda de 23% no número de meninas que receberam mais que uma dose entre os anos de 2014 e 2015; o que coloca em dúvida o real benefício para a população esse perfil vacinal inconsistente e fora das orientações da política nacional de saúde e protocolos internacionais (NOGUEIRA-RODRIGUES et al, 2017). Os países que instituíram a vacinação por volta de cinco a dez anos atrás, já realizaram estudos para avaliar os seus benefícios e obtiveram diminuição de até 90% das verrugas genitais; de 39% de NIC I; de 50% de NIC II; e 50% das lesões *in situ* (LEE; GARLAND, 2017).

2.5.2 Prevenção secundária do câncer do colo do útero

As medidas de prevenção secundária, que são também referidas como medidas de rastreamento, consistem em: citologia cervical oncótica (CCO), detecção e tipagem do HPV no colo do útero e colposcopia.

Os programas de rastreamento do CC baseados em CCO, nos quais as células cervicais esfoliadas são examinadas para prever o risco subjacente de CC, são de extrema valia. A redução substancialmente observada da incidência de CC após a introdução do rastreamento do CCO e a marcada diferença na incidência de CC entre países com e sem programas de rastreamento indicam que o teste de Papanicolaou previne consideravelmente essa malignidade, sendo um exame de baixo custo e pouca complexidade, trazendo grandes benefícios para a população (GUSTAFSSON et al., 1997). Na citologia é observada apenas as alterações celulares causadas pela

infecção do HPV, não levando em consideração o tipo de HPV, mas há o exame de tipagem de HPV (SCHIFFMAN et al., 2011). Existem evidências consistentes de ensaios clínicos randomizados de que o rastreamento do DNA carcinogênico do HPV é mais sensível do que o rastreamento citológico para a detecção de NIC 3 histológico (BULKMANS et al., 2007; RONCO et al., 2010;). Ainda mais importante, um teste negativo de HPV oferece estratificação de risco de longo prazo: cinco a dez anos de segurança (ou seja, um alto valor preditivo negativo) de não desenvolver NIC 3 e reforço ainda maior de não desenvolver câncer invasivo entre as mulheres negativas para o HPV. O alto valor preditivo negativo permite o alongamento seguro e econômico do intervalo de rastreamento citológico quando o teste de HPV é usado.

A colposcopia também é usada para prevenção secundária na medida que avalia mais abrangentemente a forma, a cor e a textura das lesões presentes no colo do útero e além disso, há a possibilidade de realizar biópsias direcionadas em áreas suspeitas. A tríade CCO, colposcopia e biópsia (histologia) é o principal tripé para o rastreamento e diagnóstico das lesões precursoras do CC (BARUT et al, 2015)

Apesar da tipagem do HPV ter se mostrado relevante no combate ao CC, o SUS ainda não a dispõe como exame de rotina populacional. Por conta disso, o uso da citologia e colposcopia como estratégia de rastreamento necessita ser implacável, uniformemente estabelecida e universalmente acessível em todo o território brasileiro para que a incidência de CC diminua no país.

2.6 Padrão histopatológico do câncer do colo do útero

Os dois tipos mais comuns de CC são o escamoso (ou epidermoide) (CCE) e o adenocarcinoma (CCA). Cerca de 80-90 % casos de CC é do tipo escamoso, 10-20% CCA e de 3-5% de outros tipos. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) e as organizações mundiais, a porcentagem entre CCE e CCA vem modificando nos últimos anos com o aumento relativo do CCA (GLOBOCAN, 2012; INCA, 2012). Os fatores de risco para os dois tipos de câncer parecem ser iguais com exceção do tabagismo e anticoncepcional oral, que é mais prevalente em casos de CCE (ZHANG; SPANDA; ROMAN, 2002; GENTHER et al., 2003;). Uma comparação entre CCE e CCA na população brasileira foi realizada por Nogueira-Rodrigues et al. (2014), incluindo 51.842 casos de CC; entre eles, 87,8%

CCE e 12,2% CCA, na qual verificou-se que pacientes com CCE são mais jovens e mais frequentemente solteiros, iletrados e consumidores de álcool e tabaco, indicando uma maior influência de fatores externos nesse subtipo de câncer. A média de idade do diagnóstico do CC foi diferente entre CCE $51,1 \pm 14,6$ e CCA $52,1 \pm 13,8$ anos ($p < 0,001$). Mais casos de CCA foram diagnosticados no estágio I (33,3%) do que casos de CCE (21,3%). Esse estudo epidemiológico corroborou com a informação de que os casos de CCA aumentaram proporcionalmente nos últimos anos no Brasil, passando de 10,2% em 2000 para 15,9% em 2009.

2.7 Tratamento nos diferentes estágios do câncer no colo do útero

O tratamento do CC varia de acordo com o estágio da doença. Para carcinoma invasivo precoce, a cirurgia é o tratamento de escolha. Em casos não cirúrgicos, a radiação combinada com quimioterapia é o padrão atual de cuidados. Em doença disseminada, a quimioterapia ou a radioterapia são tratamentos paliativos para os sintomas (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016; BOARDMAN, 2016).

O tratamento do câncer cervical frequentemente requer uma abordagem multidisciplinar com o envolvimento de um ginecologista oncológico, radiologista e oncologista clínico. O tratamento apresentado está de acordo com o NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016.

Estágio 0 (Carcinoma *in situ*)

O carcinoma *in situ* é tratado com medidas locais ablativas ou excisórias, tais como criocirurgia, ablação a laser e excisão em alça. A remoção cirúrgica é preferida na medida em que permite uma avaliação patológica adicional para excluir a doença microinvasiva. Após o tratamento, esses pacientes necessitam de vigilância (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016; BOARDMAN, 2016).

Estágio IA1

O tratamento de escolha para o estágio IA1 é a cirurgia. Histerectomia total, histerectomia radical e conização são procedimentos aceitos. A dissecação de

linfonodos não é necessária se a profundidade de invasão for inferior a 3 mm e não houver invasão linfovascular.

Pacientes selecionados com doença no estágio IA1, mas sem invasão do espaço linfovascular que desejam manter a fertilidade, podem ser submetidos à conização terapêutica com acompanhamento próximo, incluindo citologia, colposcopia e curetagem endocervical. Os pacientes com comorbidades médicas que não são candidatos cirúrgicos podem ser tratados com sucesso com radiação (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016).

Estágios IA2, IB ou IIA

Para os pacientes com doença estágios IB ou IIA, existem duas opções de tratamento: a) histerectomia radical com linfadenectomia pélvica bilateral, que é o tratamento de escolha; e b) radiação de feixe externo combinado com braquiterapia.

A traquelectomia vaginal radical com dissecação linfonodal pélvica é adequada para a preservação da fertilidade em mulheres com doença estável IA2 e naquelas com doença IB1 com lesões de até 2 (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016). Os principais problemas com a gravidez, após a traquelectomia, são insuficiência istmo-cervical e o parto prematuro (SPEISER et al., 2011).

As diretrizes cirúrgicas atuais para os estágios IA2 a IIA permitem técnicas minimamente invasivas, tais como as técnicas laparoscópicas tradicionais e as técnicas laparoscópicas assistidas roboticamente. Com efeito, tem sido demonstrado que esses procedimentos menos mórbidos são igualmente eficazes na obtenção de margens cirúrgicas adequadas e na dissecação dos linfonodos, possuindo simultaneamente a vantagem adicional de tempos de recuperação pós-operatórios mais curtos (NEZHAT et al., 2008; LOWE et al., 2009; CANTRELL et al., 2010).

A irradiação pós-operatória da pelve reduz o risco de recidiva local em pacientes com fatores de alto risco. De acordo com Sedlis et al. (1999), os fatores de risco são invasão linfovascular, acima de 1/3 de invasão estromal e tamanho tumoral > 4cm (SEDLIS et al., 1999). Peters et al. (2000) em um estudo randomizado mostrou que pacientes com comprometimento parametrial, nódulos pélvicos positivos ou margens cirúrgicas positivas também se beneficiam, com aumento de sobrevida, de uma combinação pós-cirúrgica contendo cisplatina e irradiação pélvica (PETERS et al., 2000).

A radioterapia pós-operatória também é recomendada em pacientes com pelo menos dois fatores de risco intermediários (incluindo tamanho tumoral maior do que 2 cm, invasão estromal profunda ou invasão do espaço linfovascular). Para pacientes com câncer de IB2 ou IIA e tumores maiores que 4 cm, a radiação e a quimioterapia são selecionadas na maioria dos casos. Os riscos estão associados à terapia combinada, mas muitos desses pacientes irão satisfazer critérios de risco intermediário ou alto após a histerectomia radical e, portanto, são fortes candidatos para essa abordagem.

Estágios IIB, III ou IVA

Para o CC localmente avançado (estágios IIB, III e IVA), a radioterapia foi o tratamento de escolha por muitos anos. A radioterapia começa com um curso de radiação de feixe externo para reduzir a massa tumoral e assim permitir a aplicação intracavitária subsequente. A braquiterapia é administrada por meio de aplicadores pós-carga que são colocados na cavidade uterina e vagina.

Além disso, os resultados de ensaios clínicos randomizados grandes, bem conduzidos e prospectivos, demonstraram uma melhora na sobrevivência quando a quimioterapia é combinada com a terapia de radiação. Consequentemente, o uso de quimioterapia à base de cisplatina em combinação com a radiação tornou-se o padrão de cuidados para o tratamento primário de pacientes com câncer cervical localmente avançado (KEYS et al., 1999; MORRIS et al., 1999; ROSE et al., 1999; NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016).

Estágio IVB

O estágio IVB tem uma terapêutica individualizada é utilizada em uma base paliativa. A radioterapia é usada isoladamente para o controle da hemorragia e da dor, enquanto a quimioterapia sistêmica, para a doença disseminada (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2016). Para a doença recorrente, a escolha da terapia é influenciada pelos tratamentos anteriormente empregados.

O tratamento das recidivas pélvicas após o tratamento cirúrgico primário deve incluir quimioterapia de agente único e radiação; e o tratamento de recorrências noutros locais deve incluir quimioterapia de combinação. Para a recidiva pélvica central após radioterapia, a histerectomia radical modificada ou a exenteração pélvica

podem ser consideradas (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2002; BEREK et al., 2005; GOLDBERG et al., 2006; LONG et al., 2005; MONK et al., 2009).

Para doença recorrente após quimioterapia e radioterapia, um intervalo livre de doença de mais de 6 meses é considerado para designar o tumor como sensível à platina (MOORE, 2008). O padrão de tratamento nesses casos é a quimioterapia com uma combinação à base de platina de paclitaxel e cisplatina (MOORE et al., 2004; LONG et al., 2005; MONK et al., 2009; MOORE et al., 2007).

A terapia alvo disponível hoje em dia para o CC é o bevacizumab, uma medicação anti-VEGF (*vascular endothelial growth factor*) que tem ação antiangiogênica e seu uso está indicado em pacientes que apresentam CC avançado (metastático, recorrente ou persistente). O bevacizumab foi aprovado após o ensaio clínico Gynecologic Oncology Group (GOG)240 em 2014 e recentemente foi apresentado a análise acompanhando a SG previamente avaliada, a SG nesse íterim e os efeitos adversos no período entre o ensaio clínico inicial e 2017. O benefício conferido pela incorporação do bevacizumab foi mantido com o acompanhamento prolongado como evidenciado pela curva de sobrevivência global e esses achados representam a eficácia e tolerabilidade da terapia com antiangiogênese em CC avançado (TEWARI et al, 2017).

Com algum terreno conquistado na terapia alvo, o desafio existe para identificar mais tratamentos toleráveis que possam estender ainda mais a sobrevida e até atingir resposta clínica completa. Existe uma grande janela de oportunidade para o uso de terapias alvo já que na doença avançada o tratamento quimio e radioterápico, apesar de terem tratado e curado diversos casos até hoje, também levam a uma deterioração rápida da qualidade de vida (QoL) e sobrevida mediana curta variando de 7 meses a 12 meses na maioria dos pacientes (SMALL et al, 2017).

2.8 Possíveis alvos terapêuticos no câncer do colo do útero

2.8.1 O receptor EGF e o seu papel na carcinogênese

O EGFR faz parte de uma família de quatro receptores de superfície celular de tirosina quinase distintos, denominados ErbB-1 ou EGFR, ErbB-2 ou HER-2/neu, ErbB-3 e ErbB-4. A ligação com o fator de crescimento epidérmico induz autofosforilação de EGFR que, por sua vez, ativa duas vias de sinalização a jusante, a via de proteína quinase ativada por mitógeno RAS-RAF (MAPK)/via quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) alvo de mamífero da rapamicina (mTOR) (Figura 2.8). Ambas as vias estão envolvidas em processos associados ao desenvolvimento e à progressão do tumor, tais como crescimento celular, inibição de apoptose, migração celular e angiogênese. Dado sem carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço mostraram que a superexpressão de EGFR está associada a uma fraca resposta à radioterapia e à alta taxa de recidiva local, e que a combinação do cetuximab anti-EGFR-monoclonal com radioterapia prolonga significativamente a sobrevida livre de progressão comparada com radioterapia isolada (BONNER et al, 2006). No câncer de pulmão, principalmente o de não pequenas células, a presença de mutação que ocorre no EGFR resulta em uma superexpressão e isso é fator determinante para o prognóstico, evolução e tratamento do paciente (DA CUNHA SANTOS; SHEPHERD; TSAO, 2011). O uso de monoterapia específica contra o EGFR e o tratamento personalizado no câncer de pulmão têm proporcionado benefícios aos doentes. Antes da descoberta de que apenas um subgrupo de pacientes que apresente mutação no gene EGFR obtém resposta clínica favorável com o uso de terapia alvo anti-EGFR, diversos estudos clínicos foram realizados com resultados inconclusivos nos pacientes com expressão elevada de EGFR. Essa informação dissociou a ideia da expressão do EGFR ser preditora de resposta à terapia-alvo, fazendo-se necessária a presença da mutação para que houvesse resposta clínica e indicação do uso da terapia anti-EGFR (LOPES, VATTIMO, JUNIOR, 2015).

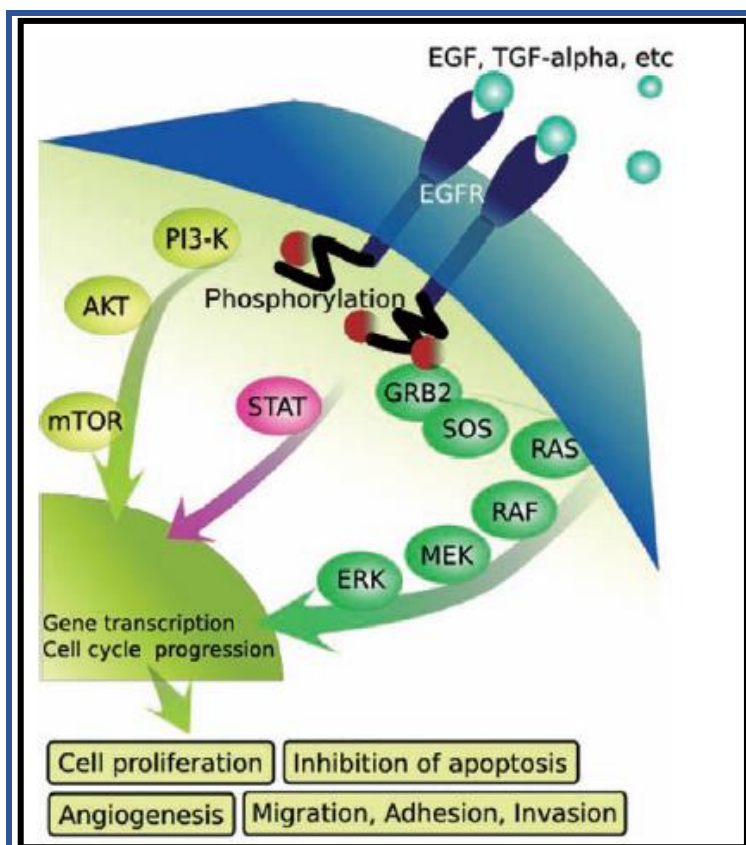


Figura 2.8: Atividade intracelular do receptor de EGFR.
 Fonte: MAHESSH, 2010.

No CC, a expressão de EGFR varia de 6% a 90%, dependendo da metodologia do estudo (ARIAS-PULIDO et al., 2008; SCHILDER et al., 2009; EL HAMDANI et al., 2010; IIDA et al., 2011; NOORDHUIS et al., 2009; SOONTHORNTHUM et al., 2011; WOODWORTH et al., 2011; WRIGHT et al., 2012). Em estudos que avaliaram somente os adenocarcinomas, a expressão elevada varia de 33-43% (ARIAS-PULIDO et al., 2008; EL HAMDANI et al., 2010; IIDA et al., 2011; SCHILDER et al., 2011; WOODWORTH et al., 2011; WRIGHT et al., 2012). A classificação de expressão e superexpressão não é bem definida, artigos disponíveis relatam ponto de corte para superexpressão que vai desde acima de 10% de positividade até acima de 33,3% de positividade (RUSCH, 1997; SELVAGGI 2004; LAVENS, 2010; LEE, 2015; JIANG, 2015). Mas independentemente dos pontos de corte usados, a superexpressão do EGFR não está diretamente relacionada à mutação do EGFR e o processo que leva a essa superexpressão ainda não foi completamente elucidado no CC. Assim como no câncer de pulmão, a investigação da mutação do EGFR pode ser um importante aliado ao tratamento do CC.

As causas da elevada ativação das vias do EGFR incluem a superexpressão do receptor e mutações ativadoras (YEWALE, 2013). A expressão de EGFR no CC pode ser ativada por proteínas E5 ou E6/E7 do HPV (AKERMAN, 2001; SPANGLE; MUNGE, 2013). O E5 ativa o EGFR por intermédio da ligação à subunidade de 16 kD da bomba de proteína ATPase conduzindo a uma redução dos receptores de EGFR. A ativação de EGFR pode iniciar cascatas bioquímicas de uma variedade de proto-oncogenes que estimulam o crescimento rápido de células (TSAI; CHEN, 2003; BUMRUNGTHAI et al., 2015).

Além disso, E6 favorece a hiperativação do receptor na presença do fator de crescimento e aumenta a internalização de EGFR fosforilado mesmo na ausência de fatores de crescimento; isso resulta em ativação prolongada do receptor e estimulação MAPK e PI3K (SPANGLE; MUNGE, 2013).

Apesar da classificação de superexpressão do EGFR no CC também ser controversa na literatura, a expressão elevada do EGFR, segundo a definição de cada autor, é um preditor independente de má resposta à radioterapia ou à quimiorradiação, baixa sobrevida livre de doença e baixa SG na doença avançada (KIM; PARK; KIM, 2002; CHO et al., 2003; GAFFNEY et al., 2003; LEE et al., 2004; NOORDHUI et al., 2009; PÉREZ-REGADERA et al., 2011). Verificou-se que esse biomarcador é um fator prognóstico independente de desfecho desfavorável também em pacientes com doença precoce tratados com cirurgia radical (KERSEMAEKERS et al., 1999). No entanto, alguns autores não conseguiram detectar qualquer correlação entre a expressão de EGFR e o risco de recorrência ou morte no CC (SCAMBIA et al., 1998; HOVE et al., 1999; SKOMEDAL et al., 1999; NGAN et al., 2001; BALTAZAR et al., 2007; YAMASHITA et al., 2009). Estudos clínicos usando terapia anti-EGFR não resultaram em resposta clínica nos casos de CC (SANTIN, 2011; HERTLEIN, 2011; FARLEY, 2011).

Conforme visto anteriormente, a superexpressão do EGFR não está diretamente relacionada à mutação do EGFR, mas pode estar presente. E assim como no carcinoma pulmonar de não pequenas células, o EGFR pode ser um importante alvo no tratamento do CC se estiver mutado. Na literatura, não há um consenso com relação à presença, à frequência e às consequências da mutação do EGFR no CC. A maioria dos estudos relata não ter encontrado essa mutação em nenhuma das amostras avaliadas (ARIAS-PULIDO et al., 2008; EL HAMDANI et al., 2010; IIDA et al.,

2011; SCHILDER et al., 2011; WOODWORTH et al., 2011, ZHANG et al 2015). Todavia, nota-se, com atenção, o fato de Wright et al. (2012), em um estudo preliminar, detectarem a mutação do EGFR em nove dos 25 casos de CC escamoso avaliados, mas no estudo final, verificou 3,8% de mutação do EGFR no CC (WRIGHT et al, 2013). Com efeito, nenhum estudo conseguiu demonstrar a mutação do EGFR no adenocarcinoma (ARIAS-PULIDO et al., 2008; EL HAMDANI et al., 2010; IIDA et al, 2011; SCHILDER et al., 2011; WOODWORTH et al., 2011; WRIGHT et al., 2012).

Este estudo visa a explorar a dicotomia na literatura com relação à presença, ou não, da mutação do EGFR no CC e sua associação com desfecho. De forma preliminar, Rodrigues (2009), na população do INCA, avaliou 38 pacientes com carcinoma escamoso do colo do útero, 84,3% apresentavam expressão de EGFR, sendo em intensidade de 2 ou 3+ em 13% delas, mas nenhuma delas apresentou mutação nesse gene.

Pelo fato do EGFR ser alvo terapêutico passível de bloqueio através de drogas disponíveis no mercado sendo utilizado com sucesso em pacientes oncológicos com mutação nesse receptor, e diante da falta de clareza da sua mutação no CC, faz-se necessário uma investigação em seu padrão mutacional e sua relação com o desfecho na população que apresenta EGFR mutado.

2.8.2 O papel da proteína PD-L1 na carcinogênese

A estratégia de combate ao câncer por meio da manipulação da resposta do sistema imunológico tem trazido respostas promissoras. Desde por volta de um século atrás já se especulava uma possível interação da resposta imunológica no desenvolvimento e combate ao câncer e, aos poucos, essa especulação foi se concretizando (PARISH, 2003). Uma das questões mais controversas na imunologia era se a resposta imune poderia ser estimulada por células malignas; o paradigma se a imunoterapia contra o câncer seria viável ou impossível pairou sobre a comunidade científica durante anos. No entanto, nos últimos anos, as evidências crescentes que o sistema imune participaria da carcinogênese e que tanto as respostas imunes inatas como adaptativas poderiam reconhecer e eliminar os tumores, revolucionaram a visão sobre o papel da imunologia na oncologia (CHEN, MELLMAN, 2013). PD-1 faz parte da família B7-CD28 (ISHIDA et al., 1992), que é um receptor inibitório da superfície

celular expresso em células T, células B, monócitos e células *natural killers* (NKT) (KEIR et al., 2008). PD-1 tem dois ligantes conhecidos: PD-L1 (B7-H1) (DONG et al., 1999) e PD-L2 (B7-DC) (LATCHMAN et al., 2001), que têm perfis de expressão distintos. Em condições normais, PD-L1 desempenha um papel importante na manutenção da homeostase imunológica, PD-L1 e PD-L2 ligam-se a receptores específicos em células T. Quando ligados aos seus receptores, a atividade das células T citotóxicas é regulada negativamente, protegendo assim as células normais dos danos colaterais.

Ambos os ligantes são expressos em células apresentadoras de antígenos, incluindo células dendríticas; mas além disso, PD-L1 é o principal mediador de PD-1- imunossupressão dependente (BRAHMER et al., 2010) em células não hematopoiéticas. A ligação de PD-L1 ou PD-L2 a PD-1 inibe a sinalização de receptores de células T e inibe a expressão de certas moléculas antiapoptóticas e citocinas pró-inflamatórias (KEIR et al., 2008). A interação de PD-1 com seus ligantes também afeta o ciclo celular, impedindo a progressão por meio da fase G1. A via PD-1 é um importante regulador da indução e manutenção da tolerância periférica (e tolerância às células "auto" malignas dentro do microambiente tumoral) (PROBST et al., 2005; KEIR et al., 2006), mantendo o equilíbrio entre a ativação das células T e a proteção de tecidos saudáveis de lesões mediadas por imunidade.

Os tumores são capazes de explorar o sistema imune homeostático regulados por meio dessas moléculas de controle. Eles podem sobrecarregar o sistema imunológico por intermédio de múltiplas estratégias, incluindo alterações na expressão do antígeno, interferindo com a iniciação de células T e favorecendo um espectro de efeitos referidos como "edição imunológica", por meio da qual os tumores alteram o seu microambiente durante o desenvolvimento para escapar da detecção imune e erradicação (DRAKE; JAFFEE; PARDOLL, 2006). Limitando respostas antitumorais de células T pela exploração de caminhos de pontos-alvo (tais como as que envolvem CTLA-4 ou PD-1), as células malignas previnem a destruição tumoral significativa e estabelecem um equilíbrio entre o tumor e o sistema imunológico, que normalmente reconhece e destrói as células não benignas. Novas imunoterapias com foco no deslocamento do equilíbrio a favor do tumor para um microambiente antitumoral, permitindo que o sistema imunológico monte uma resposta eficaz, estão

sendo desenvolvidas com alvo nas vias reguladores negativas (MCDERMOTT; ATKINS, 2013).

O uso terapêutico da manipulação imunológica na oncologia já vem sendo usado por um tempo, mas em 2011 uma nova droga chamada ipilimumabe para doentes com melanoma metastático trouxe um grande benefício. Tratava-se de um anticorpo específico ao antígeno CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), um receptor proteico presente na superfície das células T, cuja interação com a proteína CD80 e CD86, presente nas células apresentadoras de antígeno, inibe a resposta imunológica (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011).

Após esse início, terapias imunológicas promissoras, visando moléculas de controle de imunidade, têm levado a melhores resultados de sobrevida em vários tipos de malignidade incluindo os cânceres de pulmão, melanoma e câncer de bexiga (HERBST et al., 2014; POWLES et al., 2014) por atingirem taxas de respostas clínicas completas e duradouras (PENNOCK; CHOW, 2015; SHARMA; ALLISON, 2015). A terapia anti-PD-L1 revolucionou o tratamento do melanoma trazendo novo padrão de sobrevida para essa doença. A proteína PD-L1 também é fortemente expressa na neoplasia trofoblástica gestacional, sugerindo que o ligante está envolvido na evasão imune tumoral e que o tratamento anti-PD-L1 pode ser efetivo. Recentemente, foi publicado uma carta com relato de caso de 4 pacientes com neoplasia trofoblástica gestacional que foram tratados com pembrolizumab, doença que quando é irrissecável e há resistência ao tratamento quimioterápico, é fatal. Nesse grupo de 4 pacientes o pembrolizumab foi bem tolerado, apresentando apenas toxicidade leve (grau 1-2), a resposta clínica não pode ser avaliada, mas vislumbra-se a possibilidade do uso dessa imunoterapia. Foi verificado forte expressão de PD-L1 nesses pacientes, mas não foi um biomarcador de resposta à imunoterapia (GHORANI et al, 2017).

Tratamentos, anti-CTLA-4, anti-PD1 e anti PD-L1 neutralizam a ação imunossupressora na célula cancerígena no microambiente tumoral (HEEREN et al., 2016) (Figura 2.9). Terapias anti-PD-L1 estão sendo usadas em estudos clínicos em CC e resultados preliminares indicam boa resposta clínica independente da expressão de PD-L1 (SANTINI et al. 2014; FRIEDMAN C. 2016; LEEUWEBHOEK A. V. 2017; ROMANO e. et al 2017, HOLLEBECQUE et al, 2017).

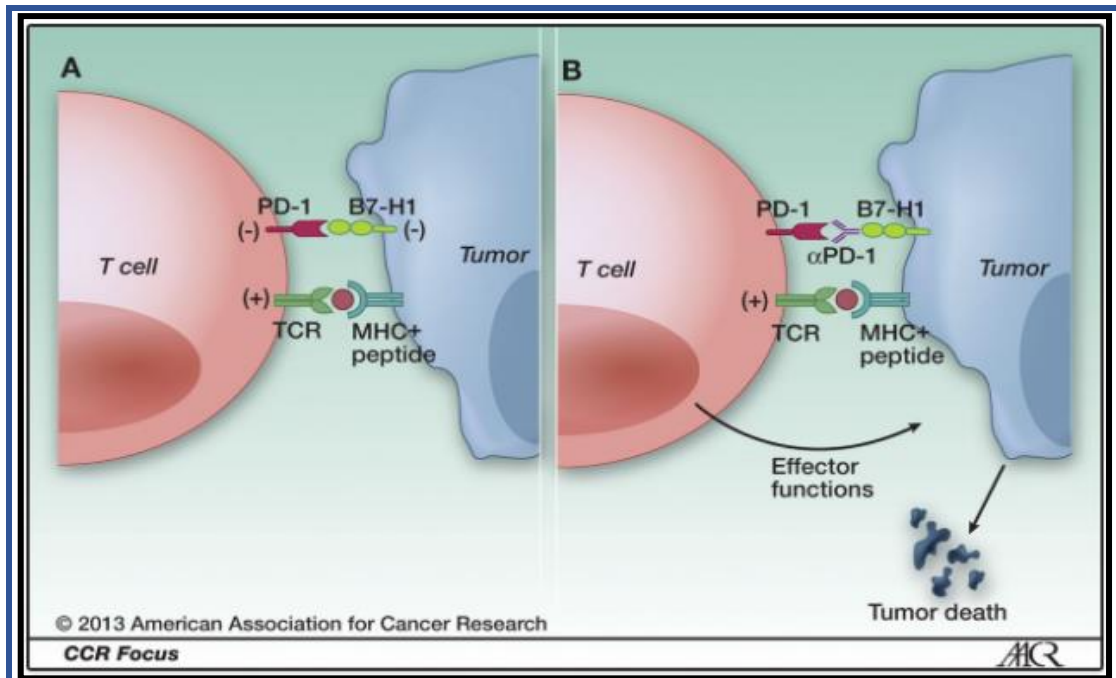


Figura 2.9: PD-1 e câncer. A: a ligação de células T PD-1 pelo tumor B7-H1 resulta na desregulação de funções efetoras de células T que destroem o tecido tumoral; B: o bloqueio dessa via por anticorpos anti-PD-1 previne a desregulação, e permite que as células T mantenham a sua funcionalidade antitumoral e a capacidade de mediar a morte das células tumorais. Fonte: SZNOL; CHEN, 2013.

Atualmente, o eixo PD-1/PD-L1 é alvo imunoterapêutico em vários tipos de câncer, mas informações significativas da expressão de PD-L1 no câncer cervical ainda estão sendo estudadas. Pelo fato da classificação da expressão de PD-L1 não estar universalmente estabelecida e além disso, a heterogeneidade intratumoral ser uma dificuldade presente (MCLAUGHLIN et al. (2016) DILL et al. 2017), esse trabalho visa investigar diferentes formas de avaliação da expressão de PD-L1 e a heterogeneidade nos casos de CC. Recentemente, uma classificação da expressão de PD-L1 foi proposta do Reedy et al 2017 levando em consideração porcentagem de células positivas e intensidade da expressão.

Com as imunoterapias e o novo perfil de resposta clínica e sobrevivência dos pacientes oncológicos levantam-se questões sobre como expandir esses benefícios por toda a oncologia. Existe a expectativa de aumentar o número de pacientes que receberão esse tratamento e obterão benefício clínico a longo prazo, mas como

predizer os pacientes que responderão positivamente ainda está sob investigação (TENG, et al., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de colo de útero tem grande impacto mundial decorrente da elevada incidência e alta mortalidade e políticas de prevenção e avanço no tratamento necessitam de grande atenção da comunidade científica.

Apesar de ter havido avanço no conhecimento e na prática da prevenção do CC, as estratégias de rastreamento têm sido implementadas de forma insatisfatória no Brasil. Além disso, o tratamento para doença inicial apresenta bons resultados, mas um tratamento eficaz para doença avançada ainda deixa a desejar. Em alusão ao que ocorre em um grupo de pacientes com carcinoma de pulmão e mutação do EGFR e em pacientes com melanoma e expressão positiva de PD-L1, vislumbra-se, a possibilidade de tratamento personalizado também para pacientes com CC diante de uma possível mutação do EGFR e expressão de PD-L1. Com isso, faz-se mister a investigação da mutação do EGFR e expressão de PD-L1 nos casos de CC.

Os dados provenientes do presente estudo poderão agregar dados à literatura com relação à exploração terapêutica da via EGFR e PD-L1 em pacientes com CC.

Nossa hipótese primária é de que um subgrupo de pacientes com CC apresente mutação do EGFR e que PD-L1 esteja expresso na população de CC.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal:

Estudar a mutação do gene EGFR e expressão de PD-L1 por imunohistoquímica em tumores de pacientes com câncer do colo do útero.

4.2 Objetivos secundários:

- 1) Comparar câncer do colo do útero adenocarcinoma e câncer do colo do útero epidermóide no que diz respeito às características demográficas, epidemiológicas e morfológicas
- 2) Caracterizar a frequência e o padrão de mutação do gene EGFR
- 3) Avaliar a expressão do PD-L1 no tumor, através da técnica de imunohistoquímica
- 4) Verificar a heterogeneidade da expressão do PD-L1 no tumor, através da técnica de imunohistoquímica
- 5) Correlacionar o padrão de expressão de PD-L1 no tumor, através da técnica de imunohistoquímica, com o prognóstico do câncer do colo do útero

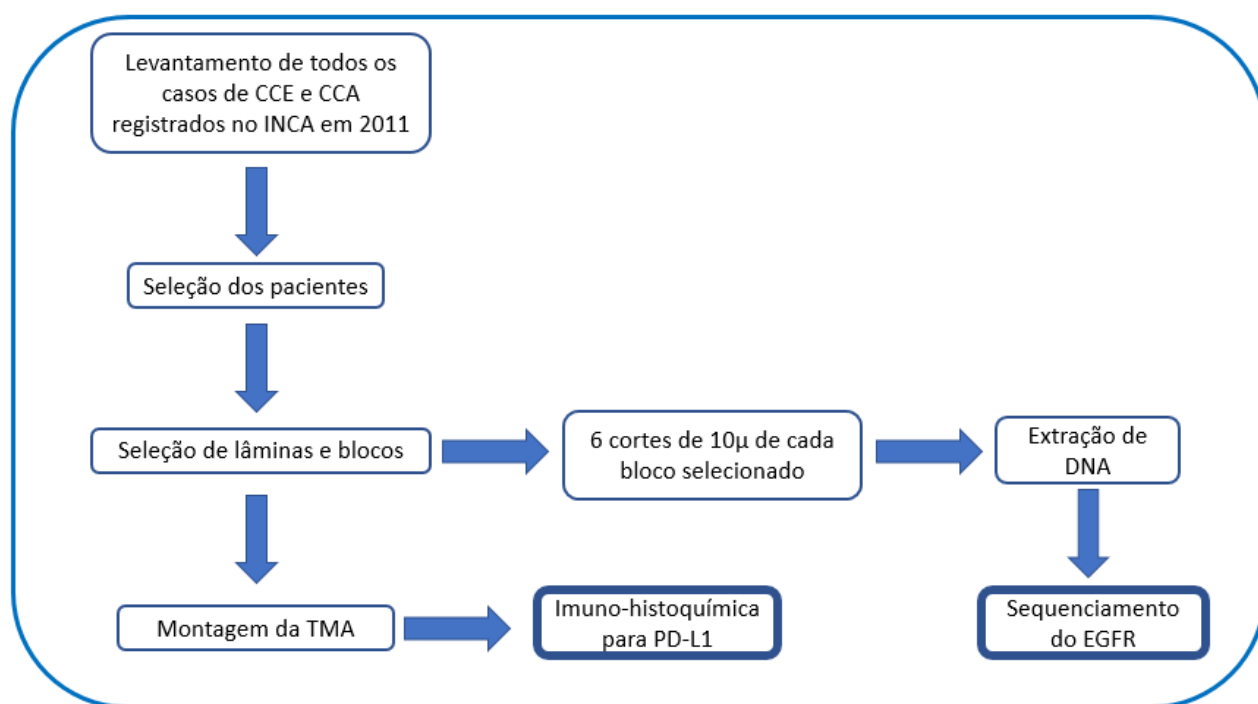
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 População-alvo

Nos últimos cinco anos, foram atendidos no INCA aproximadamente 600 casos de CC por ano. Desses, por volta de 80% foram do tipo escamoso e 20% adenocarcinoma. Com a finalidade de testar a hipótese diagnóstica, planejou-se analisar uma coorte retrospectiva com pacientes diagnosticados com CC dos tipos escamoso e adenocarcinoma, com pelo menos cinco anos de acompanhamento. Com isso, foi solicitado, ao Departamento de Patologia no INCA, que todos os casos de CC registrados no INCA no ano de 2011 fossem listados.

5.2 Delineamento do estudo (Figura 5.1)

A figura 5.1 representa do delineamento completo do estudo desde a investigação exploratória dos casos de CC no INCA em 2011 até os experimentos finais.



*CCE: câncer do colo do útero escamoso; CCA: câncer do colo do útero adenocarcinoma; PD-L1: proteína ligadora 1 de morte programada; EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

Figura 5.1: Delineamento do estudo.

O estudo foi devidamente registrado na Plataforma Brasil (CAAE: 17361013.8.0000.5274) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, em 21 de junho de 2013, recebendo isenção do uso do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). Recursos capitados por projetos de pesquisa dos colaboradores.

5.3 Critérios de inclusão e exclusão de pacientes

→Critérios clínicos de inclusão de pacientes:

- Pacientes acima de 18 anos.
- Acompanhamento do curso da doença no INCA.
- Diagnóstico patológico de CC do tipo escamoso ou adenocarcinoma.
- Pacientes que não apresentam outro tipo câncer concomitante ao CC.
- Pacientes que nunca participaram de pesquisa com uso de drogas experimentais para tratamento.

Todos os casos de CC foram caracterizados pela CID C53 – neoplasia maligna do colo do útero – e cadastrados no INCA, no ano de 2011, como:

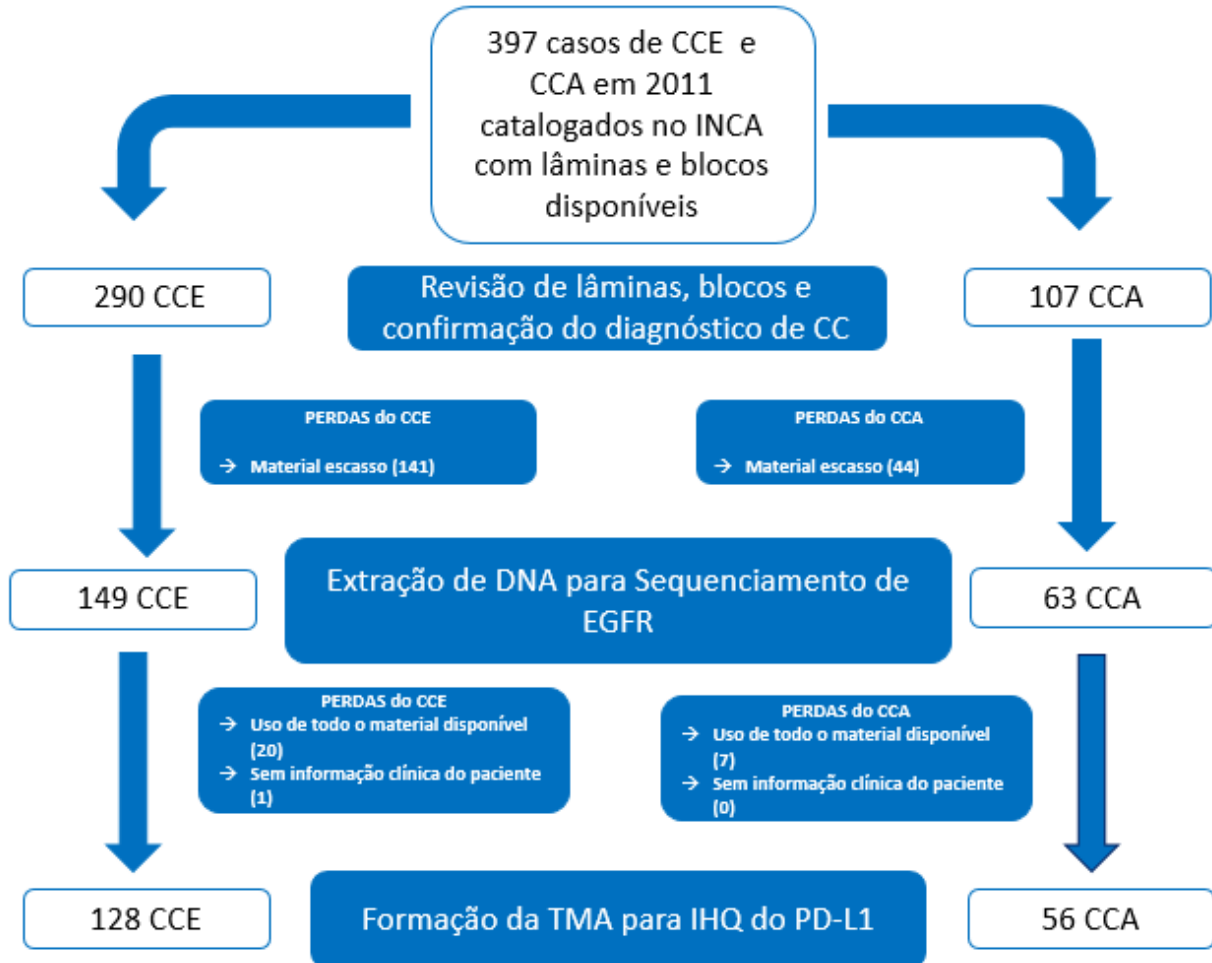
CID 10 - C53	Neoplasia maligna do colo do útero.
CID 10 - C53.0	Neoplasia maligna do endocérvix.
CID 10 - C53.1	Neoplasia maligna do exocérvix.
CID 10 - C53.8	Neoplasia maligna do colo do útero com lesão invasiva.
CID 10 - C53.9	Neoplasia maligna do colo do útero, não especificada.

→ Critérios patológicos de exclusão das amostras:

- Amostra com menos de 80% de células cancerígenas.
- Necrose acentuada (necrose foi classificada em: sem necrose, necrose leve, necrose moderada e acentuada).
- Hemorragia acentuada (hemorragia foi classificada em: sem hemorragia, hemorragia leve, hemorragia moderada e acentuada).
- Tumores microinvasores.
- Blocos com menos 0,5cm² de tecido disponível.

5.4 Perdas de pacientes

A Figura 5.2 apresenta todas as perdas que ocorreram no decorrer do estudo.



*CC: câncer do colo do útero; CCE: câncer do colo do útero escamoso; CCA: câncer do colo do útero adenocarcinoma; PD-L1: proteína ligadora 1 de morte programada; EGFR: *receptor do fator de crescimento epidérmico*; TMA: *tissue microarray*, IHQ: imuno-histoquímica.

Figura 5.2: Discriminação das perdas durante o estudo.

5.5 Revisão histopatológica

Realizou-se a revisão patológica na Divisão de Patologia no INCA, por uma patologista especializada em oncologia e acompanhada pela autora do trabalho. Foi realizada revisão patológica de todos os casos. Após a revisão das lâminas originais

do diagnóstico do câncer, solicitou-se o bloco correspondente, com o intuito de verificar se o material presente representava o corte revisado. Além disso, foi avaliada também a quantidade de tecido disponível para a extração de DNA. Os blocos escolhidos foram cortados em seis lâminas de 10 μ cada para a extração do DNA.

5.6 Variáveis coletadas

5.6.1 Variáveis histopatológicas avaliadas e coletadas

- Tipo de tumor (CCE e CCA).
- Percentagem de células tumorais (células malignas na lâmina analisada e selecionada).
- Necrose (leve, moderada e acentuada).
- Número de mitoses (número absoluto por dez campos).
- Tipo de estroma (fibroso ou fibromuscular).
- Tipo de infiltrado inflamatório (linfoplasmocitário, polimorfonuclear ou misto), quantidade (leve, moderada e acentuada) e localização (intratumoral, peritumoral ou estromal).
- Pleomorfismo (leve, moderado ou acentuado).
- Diferenciação do tumor (bem, moderada e pouco).
- Expressão de PD-L1 (percentagem absoluta de células da membrana tumoral que coraram na IHQ para PD-L1- Intensidade da expressão de PD-L1 (nível de intensidade das células positivas para PD-L1: sem expressão, leve, moderada e acentuada).

5.6.2 Variáveis coletadas na revisão de prontuário

5.6.2.1 Autodeclaração do paciente:

- Idade na menarca.
- Idade da primeira relação sexual.
- Números de parceiros até o diagnóstico do câncer.
- Número de gestações até o diagnóstico do câncer.
- Ano do último de exame de preventivo.
- Data da última menstruação.

- *Status* de pré ou pós-menopausa (menopausa foi definida como mais de um ano sem episódio menstrual).
- Tabagismo (prévio, atual ou nunca).
- Uso de contraceptivos hormonais (prévio, atual ou nunca).
- Comorbidades (hipertensão arterial, diabetes, hepatite, HIV e outras).

5.6.2.2 Avaliação por profissionais que atenderam às pacientes.

- Data do diagnóstico.
- Idade no diagnóstico do câncer (calculado baseado na data de nascimento e data do diagnóstico).
- Estágio do câncer de acordo com a classificação FIGO.
- Tamanho visível do tumor em cm.
- Tipo de tratamento (cirurgia, radioterapia, quimioterapia e braquiterapia).
- Data inicial e final de cada tratamento.
- Data da recorrência ou sem recorrência (recorrência clínica, radiológica ou histopatológica do câncer após término do tratamento). Recorrência foi considerado evidência de doença após 90 dias do término do tratamento.
- Progressão (evidência de doença constante apesar do tratamento ou até 90 dias após o tratamento).
- Data do óbito e causa (pela doença, por outra causa).
- Data e *status* da última consulta (com câncer e sem câncer).

5.7 Extração do DNA para sequenciamento do gene EGFR

Realizou-se a extração do DNA utilizando cortes de blocos de parafina. Para esse processo, inicialmente, removeu-se a parafina por meio de três lavagens com xilol, seguidas de lavagens seriadas com etanol nas concentrações de 100%, 98% e 70%. Posteriormente, utilizou-se o kit NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany), seguindo as orientações do fabricante. Ou alternativamente, usou-se o kit All Prep RNA/DNA/Protein mini da Qiagen Inc, seguindo as instruções dos fabricantes (QIAGEN, Hilden, Germany).

5.8 Quantificação e análise da qualidade dos ácidos nucleicos para sequenciamento do gene EGFR

A análise e a quantificação dos ácidos nucleicos foram realizadas usando o NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, localizado no laboratório da Coordenação de Pesquisa Clínica e Incorporação Tecnológica do INCA) (baseado em espectro absorvância, espectrofotometria). Os parâmetros de pureza e qualidade da amostra foram avaliados por meio das razões 260/280 e 260/230, de acordo com as instruções do fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Massachusetts, USA).

5.9 Amplificação do DNA e sequenciamento do EGFR

O gene EGFR está localizado no cromossomo 7p11.2 e o receptor do domínio tirosina quinase é representado pelos exons 18, 19, 20 e 21. Os éxons 18, 19, 20 e 21 do gene EGFR foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os reagentes do kit Taq DNA polimerase Platinum® e desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP), ambos da Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação de PCR de volume de 50µL, foram utilizados aproximadamente 200 ng de DNA. O termociclador utilizado foi o da marca Applied Biosystems. As sequências de iniciadores (*primers*) foram extraídas de Paez et al. (2004) ou desenhadas manualmente com o auxílio do programa FastPCR online (*primer digital*). As sequências de *primers*, bem como as temperaturas e tempos de ciclagem da reação, estão no Quadro 5.1. Alíquotas dos produtos de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% contendo GelRed® (Biotium), para confirmar a amplificação. Em seguida, os produtos foram purificados utilizando o kit Illustra GFX® PCR DNA and gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante (GE HEALTHCARE, 2008-2017). O sequenciamento desse material utilizou o kit Big-Dye Terminator (Applied Biosystems), e os mesmos *primers* da reação de PCR nos sentidos senso (F) e antissenso (R). Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com isopropanol a 75% e submetidos à eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 3130XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados manualmente no programa Sequencher® versão 4.7 (Gene Codes Corporation), com intuito de verificar presença ou ausência de mutação. Duplicatas das reações foram realizadas

independentemente para confirmação do resultado. Alternativamente, nos casos em que não se obteve a amplificação após duas tentativas de PCR, foram utilizados *primers* internos com o objetivo de dividir a sequência-alvo e facilitar o processo. Nesses casos, para amplificar cada éxon, foram utilizadas combinações de *primers* senso e antissenso interno (F e R interno) e senso interno e antissenso (F interno e R) de acordo com o Apêndice A.

Quadro 5.1: Sequência de oligonucleotídeos e temperatura de anelamento utilizados nos éxon 18, 19, 20 e 21 do EGFR.

		Sequência 5' - 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho do amplicon
Éxon 18				
1	F	GGGCTGAGGTGACCCTTGTC	60°C	1+2 = 227 pb
2	R*	TCCCACCCAGACCATGAGAG		1+4 = 182 pb
3	F interno	CTTGTCCCCCCCAGCTTGT		3+2 = 198 pb
4	R interno	TGTGCCAGGGACCTTACCTTA		
Éxon 19				
1	F*	ACCATCTCACAATTGCCAGTTAA	56°C	1+2 = 192 pb
2	R*	GAGGTTTCAGAGCCATGGAC		1+4 = 163 pb
3	F interno	CTCTCTCTGTCATAGGGACTC		3+2 = 159 pb
4	R interno	CAAAGCAGAACTCACATCG		
Éxon 20				
1	F*	TTCTGGCCACCATGCGAAG	60°C	1+2 = 277 pb
2	R*	GGCTCCTTATCTCCCCTCCC		1+4 = 181 pb
3	F interno	GGAAGCCTACGTGATGGCC		3+2 = 229 pb

4	R interno	GTGTTCCCGGACATAGTCCA		
Éxon 21				
1	F*	TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTT	59°C	1+2 = 212 pb
2	R*	ATGCTGGCTGACCTAAAGCC		1+4 = 184 pb
3	F interno	CGCAGCATGTCAAGATCAC		3+2 = 113 pb
4	R interno	ACTTTGCCTCCTTCTGCAT		

Fonte: *PAEZ et al., 2004.

5.10 Montagem do arranjo em matriz de amostras teciduais

As matrizes de amostras teciduais (TMA) foram montadas com os casos previamente selecionados e avaliados. Durante a avaliação patológica de cada caso, o médico-patologista circunscreveu a área de maior percentagem de tumor para a realização das micro-biópsias e montagem das TMA. Sempre que possível, dependendo apenas da disponibilidade de material tecidual no bloco, três amostras de cada caso foram usadas. Quando não havia material suficiente para três biópsias, foram realizadas uma ou duas biópsias.

5.11 Imuno-histoquímica para PD-L1

A técnica de Imunohistoquímica (IHQ) foi realizada em dois dias consecutivos. As lâminas comerciais, previamente tratadas com cargas (StarFrost- Knittel Glass) contendo cortes de 3 micras foram imersas em 3 banhos de 5 minutos em xilol, seguidos de banhos rápidos em álcool 100%, 90%, 80% e 70%. O excesso de álcool foi retirado em água corrente por 3 minutos. A recuperação antigênica foi em Tampão Trilogy (Cell Marque), à temperatura de 98°C, utilizando-se o processo a vapor, por 30 minutos. O bloqueio de peroxidase e o bloqueio de proteína foi feito utilizando-se o kit NovoLink Max Polymer Detection (Leica Microsystems), por 5 minutos cada. A incubação com o anticorpo primário monoclonal de camundongo, anti- PDL-1, clone 29E.2 A3 (BioLegend), à diluição de 1:400 foi realizada “overnight”, à geladeira. No

segundo dia de técnica, as lâminas foram incubadas com o anticorpo pós-primário (Novolink) e com o polímero (Novolink), ambos por 30 minutos.

Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno DAB, por 3 minutos (Novolink). A contra coloração foi feita com a hematoxilina de Haris, por 30 segundos. Após a retirada do excesso de hematoxilina em água corrente, as lâminas foram imersas em banhos de 70%, 80%, 90%, 100% e xilol. Utilizou-se o bálsamo, para a montagem das lâminas, que foram analisadas ao microscópio óptico, observando-se uma marcação membranar.

5.12 Avaliação da expressão e intensidade de PD-L1

A expressão do PD-L1 foi avaliada pela quantidade, em percentagem, das células tumorais que coraram para o anticorpo de PD-L1, por meio da técnica de IHQ. Classificou-se o PD-L1 como negativo ou positivo, sendo positivo percentagem >0%, e as subclassificações do grupo positivo foram entre $\geq 1-\leq 5\%$; $>5-\leq 25\%$; $>25-\leq 50\%$; $>50-\leq 75\%$ e $>75-100\%$. Avaliou-se a intensidade de acordo com as seguintes categorias: negativa (nenhuma reação na membrana celular), positiva fraca (reação na membrana celular circunferencial leve ou incompleta), positiva moderada (reação na membrana celular circunferencial mista e completa) e positiva intensa (reação na membrana celular circunferencial consistente e completa). Após a avaliação de cada amostra, nos casos em que havia mais de uma amostra na TMA, considerou-se, no resultado final, a amostra com maior expressão e intensidade. Como se tinha mais de um corte de uma mesma amostra por paciente, também se avaliou a percentagem de heterogeneidade entre as amostras de um mesmo caso. A heterogeneidade de expressão foi definida como diferença igual ou maior do que duas classificações; ou seja, se no mesmo caso uma amostra A apresentasse expressão entre 5-25% e a amostra B expressão entre 75-100%, isso era considerado heterogeneidade. Mas, se a expressão apresentasse diferença de no máximo uma classificação, não era considerado heterogeneidade. Por exemplo, se no mesmo caso 2, a amostra A apresentasse expressão entre 5-25% e a amostra B expressão entre 25-50%, isso não era considerado heterogeneidade. Assim também foi feita a classificação de heterogeneidade com relação à intensidade da expressão de PD-L1.

Pelo fato de a classificação da expressão e intensidade de PD-L1 não ser padronizada em nenhum tipo de câncer, realizaram-se diversas análises explorando as possíveis classificações que pudessem ter associação com prognóstico. Iniciou-se a avaliação baseada na classificação originalmente proposta para este estudo e, depois, realizaram-se análises de acordo com as subdivisões da literatura disponível. Heeren et al. (2016) consideraram PD-L1 positivo quando expresso em mais de 5%; Mezache et al. (2015) definiram positividade como $\geq 10\%$; e Reddy et al. (2017) consideraram como positivas as amostras com expressão $>0\%$. Ao juntar percentagem e intensidade, Reddy et al. (2017) foram os únicos que propuseram uma classificação: negativo (0% de expressão de PD-L1); 1A (expressão $<50\%$ com intensidade fraca); 1B (expressão $<50\%$ com intensidade moderada e acentuada); 2A (expressão $>50\%$ com intensidade fraca); e 2B (expressão $>50\%$ com intensidade moderada e acentuada), em que 1A e 1B foram considerados fracamente positivos e 2A e 2B como positivos.

5.13 Coleta de dados clínicos

Um formulário de registro de dados eletrônico (*eletronic case report form - e-CRF*) foi confeccionado pela equipe de gerenciamento de dados da Área Representativa de Pesquisa Clínica do INCA (ARPC/INCA), por meio do sistema OpenClinica Enterprise® (Apêndice B). Esse sistema é utilizado para todos os estudos institucionais coordenados pela Divisão de Ensaios Clínicos e Desenvolvimento de Fármacos, desde março de 2012, e está em concordância com as Boas Práticas Clínicas, Resolução 466/12, e Instruções de Serviço da própria ARPC.

O sistema permite inserir uma identificação única para cada participante de pesquisa do estudo, garantindo a confidencialidade desses dados. O investigador principal foi responsável pela inclusão dos dados na e-CRF, sua completude e precisão.

O aplicativo OpenClinica permite também a rastreabilidade dos dados, isto é, os dados inseridos nas e-CRF podem ser corrigidos, e as correções ficam registradas no “log” de auditoria, fornecendo assim um histórico detalhado de todos os eventos. O aplicativo é instalado no servidor do INCA, permitindo segurança e confiabilidade.

5.14 Análise estatística

Realizou-se um estudo descritivo, utilizando a média e o desvio-padrão para as variáveis contínuas e a distribuição da frequência absoluta e relativa para as variáveis categóricas. Considerando que algumas variáveis contínuas não tiveram distribuição normal, foi utilizado mediana considerando os valores mínimo e máximo. Utilizou-se o teste qui-quadrado para comparar os dois grupos de diagnóstico (CCE e CCA) quanto às variáveis do estudo.

Para avaliação exploratória inicial, realizou-se uma análise de sobrevida pelo método de Kaplan Meier, visando identificar possíveis diferenças no tempo mediano de sobrevida entre os grupos, de acordo com os fatores sociodemográficos, clínicos e moleculares. O tempo de SG foi definido como o intervalo entre a data do diagnóstico e a data do óbito e o tempo de sobrevida livre de doença, obtido pela subtração da data da confirmação da recidiva ou metástase e a data do diagnóstico de câncer. Foram considerados como censura aqueles que completaram dois e cinco anos de seguimento livres da ocorrência de desfecho (óbito, recidiva e/ou metástase) e aqueles que foram perdidos durante o seguimento. Consideraram-se falhas o diagnóstico de recidiva, metástase e óbito. O teste de log-rank foi usado para analisar a diferença de sobrevida entre os grupos.

Efetou-se a análise de regressão de COX, pelo método Enter, com o objetivo de estimar a associação entre os diferentes grupos de exposição e os desfechos. Estimou-se o efeito das variáveis independentes na sobrevida pelo *hazard ratio* (HR) e seus 95% de intervalo de confiança (95% IC). Foram inseridas, no modelo de regressão, todas as variáveis cujo valor de p foi $<0,20$ na análise univariada de COX.

A ordem de entrada das variáveis no modelo de regressão foi definida pela significância estatística. Para permanecer no modelo, foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$. O *software* utilizado para a análise estatística foi o SPSS versão 21.0 (IBM, São Paulo).

5.15 STROBE checklist

Após a conclusão do trabalho, utilizou-se o *checklist* do STROBE para estudos de coorte para uma melhor verificação da sua qualidade (Apêndice C).

6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados separadamente para CCE e CCA e as informações quanto às características clínicas, epidemiológicas e morfológicas estão descritas.

6.1 Características demográficas e epidemiológicas (Tabela 6.1) e clínicas e do tumor (Tabela 6.2)

Todos os casos selecionados de CC de 2011 que estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão formaram um total de 184, sendo 128 CCE e 56 CCA. Todos obtiveram material processado para extração de DNA e subsequente sequenciamento de EGFR e preparo da TMA. O tempo médio de sobrevida livre de progressão dessa população foi de 55,29 ($\pm 2,44$) meses e a SG de 47,47 ($\pm 2,31$) meses.

6.1.1 Características demográficas, epidemiológicas, clínicas e do tumor nos casos de CCE

Entre os casos de CCE, 28 (21,9%) tinham idade entre 18-40 anos, 67 (52,3%) entre 41-60 anos e 33 (25,8%) mais do que 60 anos. Com relação à idade da menarca 97 mulheres (77,0%) iniciaram a menstruação até os 14 anos. A primeira relação sexual ocorreu antes dos 15 anos em 39 (31,5%) das pacientes. Com relação ao número de parceiros sexuais 14 pacientes (11,7%) relataram ter tido mais do que cinco parceiros até o diagnóstico de CC. O número de nulíparas foi de 2 (1,6%) e 63 (49,6%) pacientes foram diagnosticadas na pós-menopausa. Com relação ao tempo entre o último CCO e o diagnóstico do CC, 13 pacientes (17,8%) relataram ter feito CCO no último ano (podendo o resultado ter sido benigno, pré-maligno ou maligno), 44 (60,3%) fizeram CCO entre um e três anos antes do diagnóstico de malignidade, quatro (5,5%), entre cinco e dez anos antes do CC, e cinco (6,8%) pacientes relataram que tinha mais de dez anos que não realizavam o exame preventivo. Cinquenta e nove (46,1%) mulheres eram tabagistas prévias ou atuais, 49 (38,3%) relataram ter alguma comorbidade e 76 (60,8%) já haviam feito ou faziam uso de contraceptivos hormonais.

Classificou-se o diagnóstico de CC de acordo com a FIGO em IA e IB1 em 16 (12,5%) casos; e 112 (87,5%) receberam a classificação de IB2-IVB, sendo que os

dois grupos mais frequentes foram IIIB com 50 (39,1%) casos e IIB com 38 (29,7%) casos, somando quase 70% dos casos de CCE.

Com relação ao tratamento, 25 (19,5%) foram submetidos à cirurgia, 81 (64,8%) fizeram quimioterapia, 100 (79,4%) radioterapia e 75 (60,0%) braquiterapia, sendo que o mesmo paciente pode ter passado por um ou mais tratamentos.

Notificação de recorrência ou progressão foi encontrada em 63 (49,2%) casos e 67 (52,3%) evoluíram para o óbito até o final da pesquisa. Com isso, dos 61 casos vivos, quatro (7,0%) ainda apresentavam CC e 51 (89,5%) não tinham sinais da doença na última consulta no INCA. Informação, no prontuário com relação ao *status* do câncer na última consulta, em dois pacientes, não foi encontrada.

6.1.2 Características demográficas, epidemiológicas, clínicas e do tumor nos casos de CCA.

Entre os casos de CCA, o diagnóstico ocorreu em 9 casos (16,1%) com idade entre 18-40 anos, 31 (55,4%) entre 41-60 anos e 16 (28,6%) mais do que 60 anos. A menarca ocorreu até os 14 anos em 41 (74,5%) pacientes. Com relação à idade de início da atividade sexual, 4 (7,7%) pacientes iniciaram atividade sexual até os 15 anos e 9 pacientes (17,0%) relatam ter tido mais do que cinco parceiros até o diagnóstico de CC. O total de pacientes nulíparas foi de 4 (7,1%) e 34 (60,7%) foram diagnosticadas na pós-menopausa. Com relação ao tempo entre o último preventivo e o diagnóstico, três pacientes (7,1%) relataram ter feito CCO no último ano; 30 (71,4%) fizeram CCO entre um e três anos antes do diagnóstico de malignidade; dois (4,80%) entre três e cinco anos; três (7,1%) entre cinco e dez anos antes do CC; e quatro (9,5%) pacientes relataram que o último exame de preventivo tinha mais de dez anos. Dezenove (33,9%) pacientes eram tabagistas prévias ou atuais, 26 (46,6%) relataram ter alguma comorbidade e 38 (69,1%) já tinham feito ou faziam uso de contraceptivos hormonais.

Classificou-se o diagnóstico de CC em FIGO IA e IB1 em 13 (23,2%) casos e 43 (76,8%) receberam a classificação de IB2-IVB, sendo que os três grupos mais frequentes foram IIB com 17 (30,4%) casos e IB1 e IIIB com 13 (23,3%) casos cada, somando 77,0% da amostra de CCA.

Com relação ao tratamento, 18 (32,1%) foram submetidos à cirurgia, 29 (52,7%) fizeram quimioterapia, 39 (70,9%) radioterapia e 34 (61,8%) braquiterapia, sendo que o mesmo paciente pode ter passado por um ou mais tratamentos.

Encontrou-se notificação de recorrência ou progressão em 31 (55,4%) casos e 25 (44,6%) evoluíram para o óbito até o final do seguimento. Com isso, 31 casos, não óbitos, tiveram uma última consulta no INCA; desses, quatro (13,8%) apresentavam CC e 25 (86,2%) não tinham sinais da doença.

6.1.3 Comparação entre CCE e CCA

Ao se comparar as populações de CCE e CCA, foram verificadas algumas variáveis com diferenças estatisticamente significantes entre elas: idade da primeira relação sexual ($p=0,003$) e FIGO ($p=0,008$).

Tabela 6.1: Características demográficas e epidemiológicas dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma

Variáveis	Escamoso (N=128)	Adenocarcinoma (N=56)	Total (184*)	p-valor
Idade (anos)				0,659
18-40	28 (21,9%)	9 (16,1%)	37 (20,1%)	
41-60	67 (52,3%)	31 (55,4%)	98 (53,3%)	
>61	33 (25,8%)	16 (28,6%)	49 (26,6%)	
Idade da menarca (anos)				0,723
≤14	97 (77,0%)	41 (74,5%)	138 (76,2%)	
>15	29 (23,0%)	14 (25,5%)	43 (23,8%)	
Idade da primeira relação sexual (anos)				0,003
<15	39 (31,5%)	4 (7,7%)	43 (24,4%)	
15-20	64 (51,6%)	39 (75,0%)	103 (58,5%)	
>20	121 (16,9%)	9 (17,3%)	30 (17,0)	
Número de parceiros				0,343
0-5	106 (88,3%)	44 (83,0%)	150 (86,7%)	
6 ou mais	14 (11,7%)	9 (17,0%)	23 (13,3%)	
Gestação prévia				0,072
Sim	125 (98,4%)	52 (92,9%)	177 (96,7%)	
Não	2 (1,6%)	4 (7,1%)	6 (3,3%)	
Menopausa				0,165
Sim	63 (49,6%)	34 (60,7%)	97 (53,0%)	
Não	64 (50,4%)	22 (39,3%)	86 (47,0%)	
Tempo entre o último CCO e o diagnóstico do câncer (anos)				0,426
<1	13 (17,8%)	3 (7,1%)	16 (13,8%)	
1-3	44 (60,3%)	30 (71,4%)	74 (63,8%)	
3-5	7 (9,6%)	2 (4,8%)	9 (7,8%)	
5-10	4 (5,5%)	3 (7,1%)	7 (6,1%)	
>10	5 (6,8%)	4 (9,5%)	9 (7,8%)	
Tabagismo (atual ou prévio)				0,124
Sim	59 (46,1%)	19 (33,9%)	78 (42,4%)	
Não	69 (53,9%)	37 (66,1%)	106 (57,6%)	
Comorbidades				0,301
Sim	49 (38,3%)	26 (46,6%)	75 (40,8%)	
Não	79 (61,7%)	30 (53,9%)	109 (59,2%)	
Uso de contraceptivo hormonal (atual ou prévio)				0,288
Sim	76 (60,8%)	38 (69,1%)	114 (63,3%)	
Não	49 (39,2%)	17 (30,9%)	66 (36,7%)	

*As somas menores que 184 nas variáveis expostas se devem a ausência de informação. CCO: citologia cervical oncológica; DP: desvio-padrão; em negrito os valores de $p < 0,05$.

Tabela 6.2: Características clínicas e do tumor dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma

Variáveis	Escamoso (N=128)	Adenocarcinoma (N=56)	Total (184*)	p-valor
FIGO				0,008
Ia	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (0,5%)	
Ib1	15 (11,7%)	13 (23,2%)	28 (15,2%)	
Ib2	9 (7,0%)	9 (16,0%)	18 (9,8%)	
IIa	5 (3,9%)	1 (1,8%)	6 (3,3%)	
IIb	38 (29,7%)	17 (30,4%)	55 (29,9%)	
IIIa	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (0,5%)	
IIIb	50 (39,1%)	13 (23,2%)	63 (34,2%)	
IVa	3 (2,3%)	2 (3,6%)	8 (4,3%)	
IVb	3 (2,4%)	1 (1,8%)	4 (2,2%)	
FIGO grupos				0,066
Ia e Ib1	16 (12,5%)	13 (23,2%)	29 (15,8%)	
Ib2-IVb	112 (87,5%)	43 (76,8%)	155 (84,2%)	
Tamanho do tumor (cm)				0,008
≤4	42 (34,1%)	30 (55,6%)	72 (40,7%)	
>4	81 (65,9%)	24 (44,4%)	105 (59,3%)	
Cirurgia				0,063
Sim	25 (19,5%)	18 (32,1%)	43 (23,4%)	
Não	103 (80,5%)	38 (67,9%)	141 (76,6%)	
Linfonodo positivo em pacientes que fizeram cirurgia				0,151
Sim	7 (29,2%)	2 (11,1%)	9 (21,4%)	
Não	11 (70,8%)	16 (88,9%)	27 (78,6%)	
Invasão linfovascular em pacientes que fizeram cirurgia				0,233
Sim	6 (25,0%)	2 (11,1%)	8 (19,0%)	
Não	18 (75,0%)	16 (88,9%)	34 (81,0%)	
Quimioterapia				0,138
Sim	81 (64,8%)	29 (52,7%)	110 (61,1%)	
Não	44 (35,2%)	26 (47,3%)	70 (38,9%)	
Radioterapia				0,215
Sim	100 (79,4%)	39 (70,9%)	139 (76,8%)	
Não	26 (20,6%)	16 (29,1%)	42 (23,2%)	
Braquiterapia				0,818
Sim	75 (60,0%)	34 (61,8%)	109 (60,6%)	
Não	50 (40,0%)	21 (38,2%)	71 (39,4%)	
Quimiorradioterapia				0,310
Sim	97 (81,5%)	45 (75,0%)	142 (79,3%)	
Não	22 (18,5%)	15 (25,0%)	37 (20,7%)	
Recorrência ou progressão				0,443
Sim	63 (49,2%)	31 (55,4%)	94 (51,1%)	

Não	65 (50,8%)	25 (44,6%)	90 (48,9%)	
Óbito até o último seguimento				0,634
Sim	67 (52,3%)	27 (48,2%)	128 (69,6%)	
Não	61 (47,7%)	29 (51,8%)	56 (30,4%)	
Óbito em 60 meses				0,525
Sim	64 (50,0)	25 (44,6)	89 (48,4)	
Não	64 (50,5)	31 (55,4)	95 (51,6)	
Status na última consulta				0,335
Com vidência de doença	4 (6,5%)	4 (13,8%)	8 (8,8%)	
Em remissão da doença	55 (90,3%)	25 (86,2%)	81 (89,0%)	
Sem informação precisa	2 (3,2%)	0 (0,0%)	2 (2,2%)	
Sobrevida livre de progressão (meses), média	6,88 (\pm 13,60)	19,13 (\pm 20,15)	11,00 (\pm 17,14)	0,002
Sobrevida global (meses), média (DP)	39,03 (\pm 27,10)	44,07 (\pm 24,49)	40,56 (\pm 26,37)	0,152
Recorrência ou progressão após 90 dias				0,094
Sim	22 (27,2%)	21 (41,2%)	43 (32,6%)	
Não	69 (72,8%)	30 (58,8%)	89 (67,4%)	

FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria; DP: desvio-padrão; em negrito os valores de $p < 0,05$.

Fonte: A autora.

6.2 Características morfológicas (Tabela 6.3)

Ao todo, foram extraídas informações morfológicas de 128 casos de CCE e 56 casos de CCA.

6.2.1 Características Morfológicas no CCE

A percentagem de câncer na amostra examinada foi de 77,09 (\pm 12,33) e a de estroma foi de 16,81 (\pm 10,49). A média de mitoses foi de 20,02 (\pm 15,30) e 48 (39,0%) casos tinham mais de 20 mitoses em dez campos. O tipo de estroma ficou classificado em 44,8% fibroso e 55,2% fibromuscular. Com relação ao infiltrado inflamatório, 49,6% era leve, 38,4% moderado e 12,0% acentuado, com predomínio de localização intratumoral ou peritumoral (89,9%) e perfil linfoplasmocitário (80,0%). Considerou-se o pleomorfismo acentuado em 36,8% dos casos e leve em apenas 1,6%; com relação à diferenciação do tumor, a maioria foi classificada como moderado (66,7%), sendo 10,0% bem diferenciados e 23,3% pouco diferenciados.

6.2.2 Características morfológicas no CCA

A percentagem de câncer na amostra examinada foi de 82,0 ($\pm 8,20$) e a de estroma foi de 10,64 ($\pm 7,01$). A média de mitose foi de 12,55 ($\pm 15,45$) e oito (16,3%) casos tinham mais de 20 mitoses em dez campos. Classificou-se o tipo de estroma em 23,6% fibroso e 76,4% fibromuscular. Com relação ao infiltrado inflamatório, 52,7% era leve, 30,9% moderado e 16,4% acentuado com predomínio de localização intratumoral e peritumoral (72,7%) e perfil linfoplasmocitário em 56,4%. Considerou-se o pleomorfismo acentuado em 20,0% dos casos e leve em 16,4%; com relação à diferenciação do tumor, a maioria foi classificada como moderado 51,8%, sendo 22,2% bem diferenciados e 25,9% pouco diferenciados.

6.2.3 Comparação das características morfológicas dos casos de CCE e CCA

Na comparação entre os dois tipos histológicos, algumas variáveis foram estatisticamente significantes: mitose ($p=0,004$), tipo de estroma ($p=0,007$), tipo inflamatório ($p=0,003$), local da inflamação ($p=0,004$) e pleomorfismo ($p<0,001$).

Tabela 6.3: Característica morfológicas dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma

Variáveis morfológicas	Escamoso (N=128)	Adenocarcinoma (N=56)	Total (N=184)	p-valor
Percentagem de câncer	77,09 (±12,33)	82,00 (±8,20)	78,57 (±11,45)	0,007
Percentagem de estroma	16,81 (±10,49)	10,64 (±7,01)	14,86 (±9,93)	<0,001
Mitoses	20,02 (±15,30)	12,55 (±15,45)	17,91 (±15,67)	0,004
Mitose (por 10 campos)				0,004
≤20	75 (61,0%)	41 (67,4%)	116 (67,4%)	
>20	48 (39,0%)	8 (16,3%)	56 (32,6%)	
Tipo de estroma				0,007
Fibroso	56 (44,8%)	13 (23,6%)	69 (38,3%)	
Fibromuscular	69 (55,2%)	42 (76,4%)	111 (61,7%)	
Quantidade de infiltrado inflamatório				0,545
Leve	62 (49,6%)	29 (52,7%)	91 (50,6%)	
Moderado	48 (38,4%)	17 (30,9%)	65 (36,1%)	
Acentuado	15 (12,0%)	9 (16,4%)	24 (13,3%)	
Tipo de infiltrado inflamatório				0,003
Linfoplasmocitário	101 (80,8%)	31 (56,4%)	132 (73,3%)	
Polimorfonucleares	6 (4,8%)	5 (9,1%)	11 (6,1%)	
Misto	18 (14,4%)	19 (34,5%)	37 (20,6%)	
Tipo da inflamatório levando em consideração apenas polimorfonucleares				0,001
Ausência de polimorfonucleares	101 (80,8%)	31 (56,4%)	132 (73,3%)	
Presença de polimorfonucleares	24 (19,2%)	24 (43,6%)	48 (26,7%)	
Local da inflamação				0,004
Intratumoral ou peritumoral	107 (89,9%)	40 (72,7%)	147 (84,5%)	
Exclusivamente estroma	12 (10,1%)	15 (27,3%)	27 (15,5%)	
Pleomorfismo				<0,001
Leve	2 (1,6%)	9 (16,4%)	11 (6,1%)	
Moderado	77 (61,6%)	35 (63,6%)	112 (62,2%)	
Acentuado	46 (36,8%)	11 (20,0%)	57 (31,7%)	
Grau de diferenciação tumoral				0,065
Pouco diferenciado	12 (10,0%)	12 (22,2%)	24 (13,8%)	
Moderadamente diferenciado	80 (66,7%)	28 (51,8%)	108 (62,1%)	
Bem diferenciado	28 (23,3%)	14 (25,9%)	42 (24,1%)	

Em negrito os valores de p<0,05.

6.3 Mutação do gene EGFR

Entre os 128 CCE e 56 CCA selecionados para a extração de DNA, obteve-se boa qualidade em 93 CCE e 35 CCA e essas amostras passaram pelo processo de amplificação dos éxons 18, 19, 20 e 21 do EGFR e sequenciamento. Apenas uma mutação foi encontrada em uma amostra de CCE. Ocorreu no éxon 18 uma substituição do aminoácido glutamato por glutamina na posição 711 (E711Q ou c.2131G>C).

6.4 Expressão e intensidade de PD-L1 (Tabela 6.4)

Entre os 184 (128 CCE e 56 CCA) pacientes previamente selecionados para a extração de DNA, sequenciamento e montagem da TMA, 156 (108 CEC e 48 CCA) casos puderam ser avaliados para a reação de IHQ de PD-L1. Foram registradas 16 perdas de CCE e seis de CCA decorrentes da falta de material suficiente no bloco após a extração de DNA. Além disso, houve quatro perdas de CCE e duas perdas de CCA; pois, apesar de terem material para TMA, não apresentavam tecido neoplásico na biópsia da TMA, contendo apenas necrose ou tecido não neoplásico, impossibilitando a avaliação da expressão de PD-L1.

Os resultados da expressão e intensidade do PD-L1 encontram-se na Tabela 6.4. No total, 83 (53,2%) amostras foram positivas para PD-L1; entre elas, 65 (60,2%) de CCE e 18 (37,5%) de CCA. As análises de CCE e CCA são apresentadas separadamente para proporcionar melhor exploração dos dados expostos, visto que esses dois tipos de CC têm características distintas. As Figuras 6.1 e 6.2 demonstram as intensidades negativa, fraca, moderada e acentuada do PD-L1 em CCE e CCA

Tabela 6.4: Característica da expressão de PD-L1 dos casos de câncer do colo do útero escamoso e adenocarcinoma

Variáveis moleculares	Escamoso (N=128)	Adenocarcinoma (N=56)	Total (N=184)	p-valor
Expressão de PD-L1				0,009
Sem expressão	43 (39,8%)	30 (62,5%)	73 (46,8%)	
Com expressão	65 (60,2%)	18 (37,5%)	83 (53,2%)	
Expressão de PD-L1				0,004
Sem expressão	43 (39,8%)	30 (62,5%)	73 (46,8%)	
1-5%	11 (10,2%)	10 (20,8%)	21 (13,5%)	
5-25%	20 (18,5%)	3 (6,2%)	23 (14,7%)	
25-50%	19 (17,6%)	2 (4,2%)	21 (13,5%)	
50-75%	7 (6,5%)	1 (2,1%)	8 (5,1%)	
75-100%	8 (7,4%)	2 (4,2%)	10 (6,4%)	
Heterogeneidade na expressão de PD-L1				0,228
Sim	12 (11,1%)	2 (4,0%)	14 (8,9%)	
Não	96 (88,9%)	48 (96,0%)	144 (91,1%)	
Intensidade da expressão de PD-L1				0,009
Sem expressão	43 (39,8%)	30 (62,5%)	73 (46,8%)	
Fraca	39 (36,1%)	15 (31,2%)	54 (34,6%)	
Moderada	22 (20,4%)	3 (6,2%)	25 (16,0%)	
Acentuada	4 (3,7%)	0 (0,0%)	4 (2,6%)	
Heterogeneidade da intensidade da expressão de PD-L1				1,000
Sim	1 (0,9%)	0 (0,0%)	1 (0,6%)	
Não	107 (99,1%)	48 (100,0%)	155 (99,4%)	
Classificação PD-L1 de acordo com Reddy et al (2017).				0,022
Negativo	43 (39,8%)	30 (62,5%)	73 (46,8%)	
1A	35 (32,4%)	14 (29,2%)	49 (31,4%)	
1B	15 (13,9%)	1 (2,1%)	16 (10,3%)	
2A	4 (3,7%)	1 (2,1%)	5 (3,2%)	
2B	11 (10,2%)	2 (4,2%)	13 (8,3%)	

Em negrito os valores de $p < 0,05$.

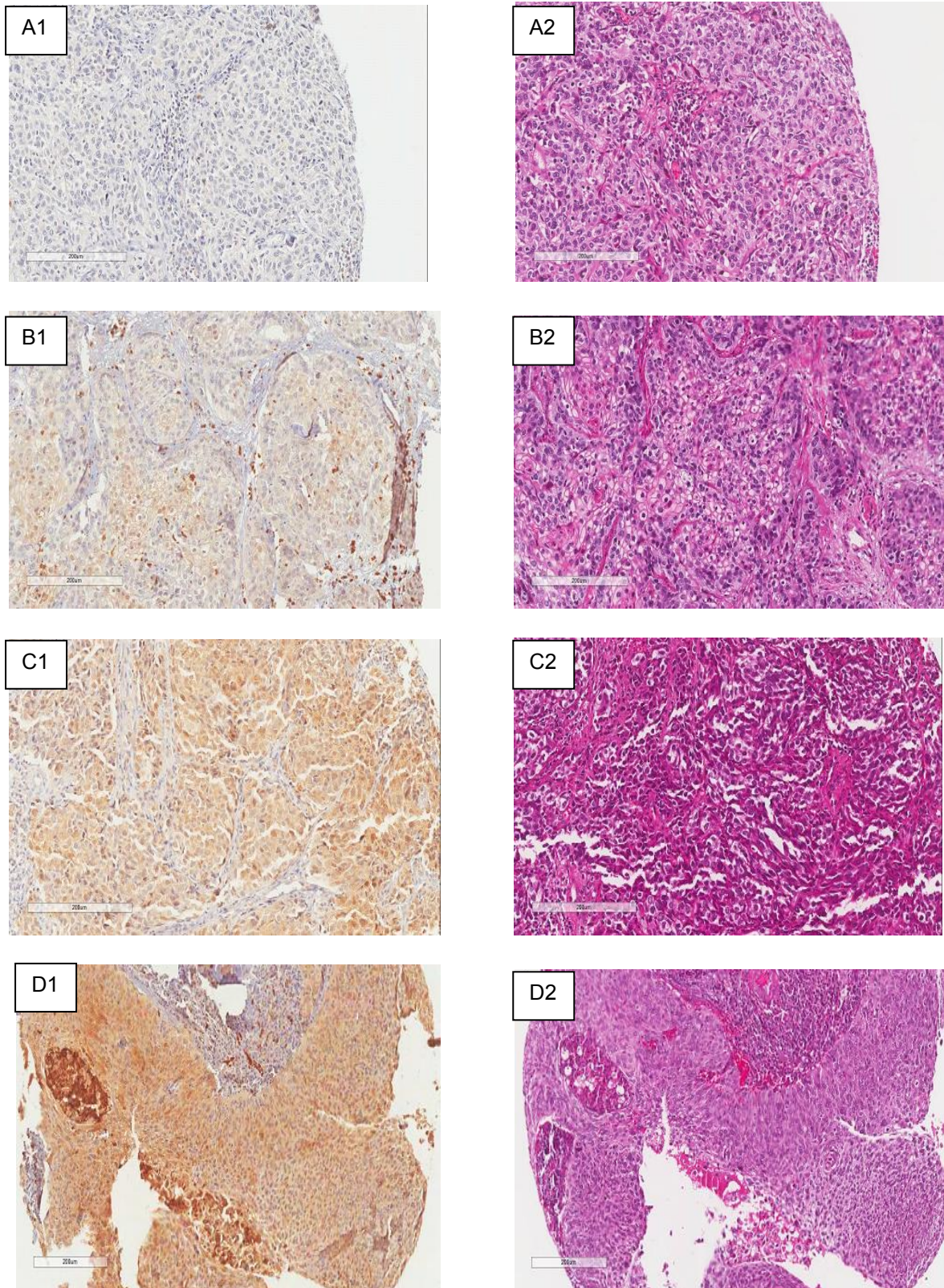
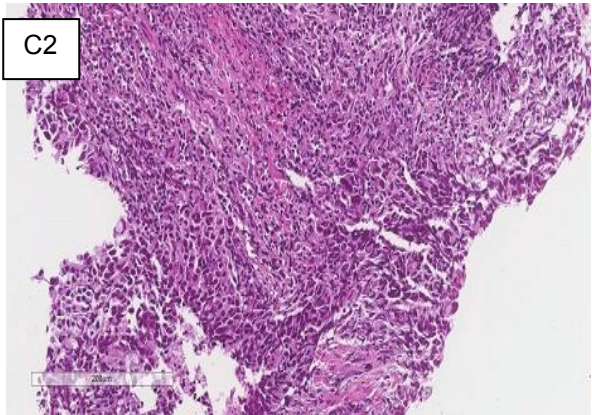
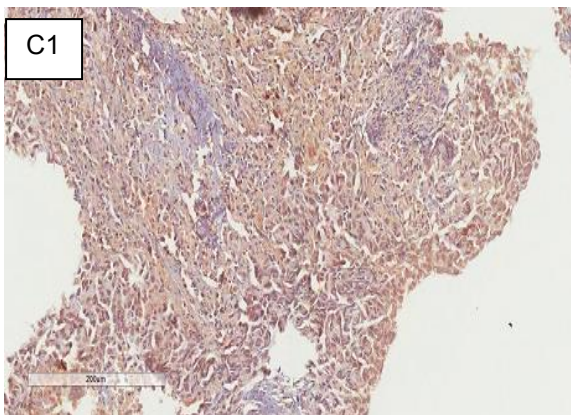
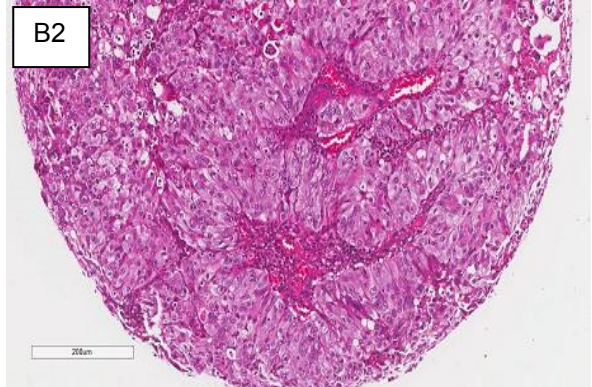
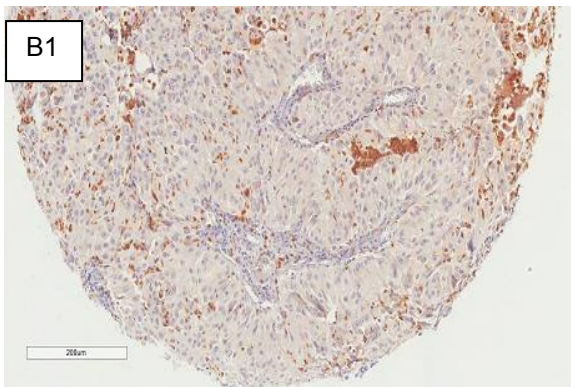
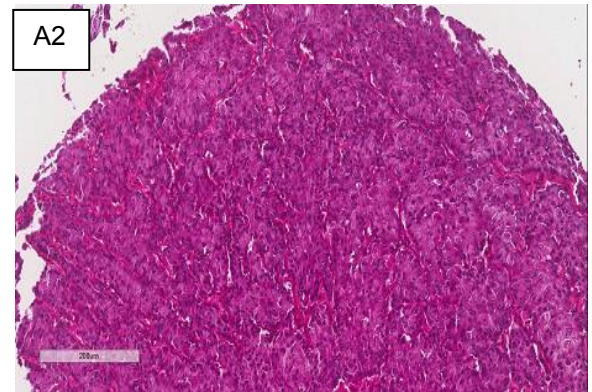
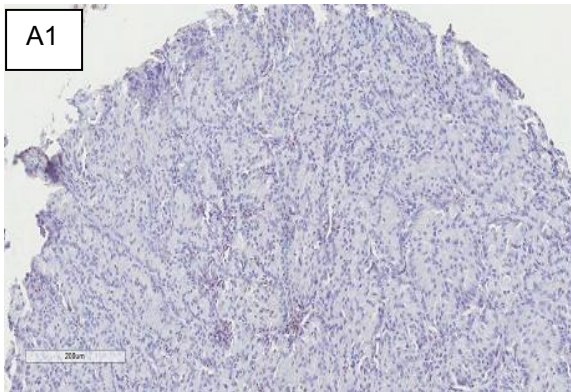


Figura 6.1: Foto da TMA demonstrando a classificação de intensidade da coloração na IHQ (1) e a hematoxilina e eosina (2) no mesmo corte. A: CCE PD-L1 negativo; B: CCE PD-L1 fraco; C: CCE PD-L1 moderado; D: CCE PD-L1 acentuado. Fotos usando o programa Aperio®.



Fotos Figura 6.2: Foto da TMA demonstrando a classificação de intensidade da coloração na IHQ (1) e a Hematoxilina e eosina (2) no mesmo corte. A: CCA PD-L1 negativo; B: CCA PD-L1 fraco; C: CCA PD-L1 moderado. Fotos usando o programa Aperio®.

6.4.1 Características da expressão e PD-L1 em CCE

Entre os 108 casos de CCE, 65 (60,2%) foram positivos para PD-L1, 11 (10,2%) tiveram positividade entre 1-5%, 20 (18,5%) entre 5-25%; ou seja, 31 (28,7%) apresentaram de 1-25% de células tumorais positivas. Dezenove (17,6%) casos tiveram positividade entre 25-50%, sete (6,5%) entre 50-75%, e oito (7,4%), entre 75-100%, tinham células malignas positivas para PD-L1.

Dos 108 casos de CCE, 98 obtiveram mais de uma amostra avaliada, entre eles, 12 (11,1%) apresentaram heterogeneidade na expressão de PD-L1. Dos 65 pacientes com alguma positividade em uma das amostras, 13 obtiveram pelo menos um resultado negativo (Quadro 6.1); ou seja, 20% dos casos apresentaram amostras negativas e positivas no mesmo câncer.

Quadro 6.1 Casos de CCE que apresentaram amostras negativa e positiva para expressão de PD-L1

Paciente/amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Paciente A	Negativo	Negativo	até 5%
Paciente B	Negativo	Negativo	até 5%
Paciente C	Negativo	Negativo	5-25%
Paciente D	Negativo	Negativo	5-25%
Paciente E	Negativo	Negativo	5-25%
Paciente F	Negativo	até 5%	até 5%
Paciente G	Negativo	até 5%	até 5%
Paciente H	Negativo	até 5%	até 5%
Paciente I	Negativo	até 5%	5-25%
Paciente J	Negativo	5-25%	5-25%
Paciente K	Negativo	25-50%	25-50%
Paciente L	Negativo	25-50%	-
Paciente M	Negativo	50-75%	-

- sem material

Com relação à intensidade da expressão de PD-L1, dos casos positivos, 39 (36,1%) tinham intensidade fraca; 22 (20,4%) moderada; e quatro (3,7%) acentuada. Entre os casos que tinham mais de uma amostra na TMA, apenas um (0,9%) apresentou heterogeneidade na intensidade da expressão.

Ao usar a classificação proposta por Reddy et al. (2017), dos 65 casos positivos, 35 (32,4%) eram 1A; 15 (13,9%) 1B; quatro (3,7%) 2A; e 11 (10,2%) 2B.

Pelo fato de as classificações da expressão e intensidade de PD-L1 não serem padronizadas no CC, foram utilizadas diversas análises explorando as possíveis classificações que tenham associação com progressão ou recorrência e sobrevida.

6.4.2 Características da expressão e PD-L1 em CCA

Entre os casos 48 de CCA, 18 (37,5%) foram positivos para PD-L1; desses, dez (20,8%) tiveram positividade entre 1-5%, três (6,2%) entre 5-25%; ou seja, 13 (27,0%) apresentaram de 1-25% de células tumorais positivas. Dois (4,2%) casos tiveram positividade entre 25-50%; um (2,1%) entre 50-75%; e dois (4,2%) entre 75-100%.

Dos 48 casos de CCA, 45 tinham mais de uma amostra na TMA e apenas dois (4,0%) apresentaram heterogeneidade. Entre os 18 pacientes com mais de uma amostra e positividade em pelo menos uma delas, nove obtiveram pelo menos uma amostra negativa (Quadro 6.2); ou seja, 50,0% dos casos apresentaram amostras negativas e positivas no mesmo câncer.

Quadro 6.2: Casos de CCA que apresentaram amostras negativa e positiva para expressão de PD-L1

Paciente/amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Paciente A	Negativo	Negativo	<5%
Paciente B	Negativo	Negativo	<5%
Paciente C	Negativo	Negativo	<5%
Paciente D	Negativo	Negativo	<5%
Paciente E	Negativo	Negativo	<5%
Paciente F	Negativo	<5%	<5%
Paciente G	Negativo	<5%	<5%
Paciente H	Negativo	5-15%	-
Paciente I	Negativo	50-75%	75-100%

- sem material

Com relação à intensidade da expressão de PD-L1, dos casos positivos, 15 (31,2%) tinham intensidade fraca, três (6,2%) moderada e nenhum acentuada. Entre

os casos que tinham mais de uma amostra na TMA, nenhum apresentou heterogeneidade.

Ao usar a classificação proposta por Reddy et al. (2017), dos 18 casos positivos, 14 (29,2%) eram 1A; um (2,1%) 1B; um (2,1%) 2A; e dois (4,2%) 2B.

6.4.3 Comparação da expressão de PD-L1 nos casos de CCE e CCA

Na comparação entre o padrão de expressão de PD-L1 entre os dois tipos histológicos, verifica-se que a quantidade dos casos que foram positivos para PD-L1 ($p=0,009$), a percentagem ($p=0,004$) e a intensidade ($p=0,009$) foram estatisticamente distintas.

6.5 Sobrevida global em cinco anos

Ao analisar separadamente os casos de CCE e CCA com relação à sobrevida, o poder estatístico foi diminuído; mas, mesmo assim, decidiu-se fazer dessa forma ao se perceber que os diferentes tipos histológicos se comportam de forma distinta. Em muitas variáveis, apesar de não alcançar a significância estatística, foram verificados uma tendência da influência no desfecho do CC. Essas informações também foram exploradas visando a oferecer uma visão ampla e apresentando informações que podem ajudar a pavimentar estrada para futuras pesquisas. Percebe-se que houve perda de seguimento dos pacientes com CCE, entretanto, não se verificou perda no CCA.

6.5.1 Avaliação de sobrevida nos casos de CCE

A análise de sobrevida das variáveis epidemiológicas, clínicas e morfológicas encontram-se no anexo D. Entre elas, idade de menarca, FIGO, tipo de tratamento, tamanho visível do tumor, tratamento e progressão e recorrência, tipo inflamatório, pleomorfismo, diferenciação e expressão de PD-L1 foram estatisticamente significantes na análise de Kaplan Meier. A análise de COX das mesmas variáveis encontra-se no anexo D junto à tabela com as variáveis independentes que estão associadas à sobrevida em cinco anos nos casos de CCE, que foram FIGO, pleomorfismo e tipo inflamatório.

6.5.2 Avaliação de sobrevida nos casos de CCA

A análise de sobrevida das variáveis epidemiológicas, clínicas e morfológicas encontram-se no anexo D. Entre elas, menopausa, idade avançada, FIGO, tratamento, progressão e recorrência e pleomorfismo foram estatisticamente significantes na análise de Kaplan Meier. A análise de COX das mesmas variáveis encontra-se no anexo D junto à tabela com as variáveis independentes que estão associadas à sobrevida em cinco anos nos casos de CCA, que foram FIGO e idade avançada ou FIGO e menopausa.

6.5.3 Curvas de Kaplan Meier

As Figuras 6.3, 6.4, 6.5 e 6.6 mostram as curvas de Kaplan Meier para expressão PD-L1 nos casos de CCE e CCA separadamente. Ao avaliar a expressão de PD-L1 usada nesse trabalho e a classificação usada por Reddy et al, 2017, nenhuma delas aparece como preditor de sobrevida na população analisada.

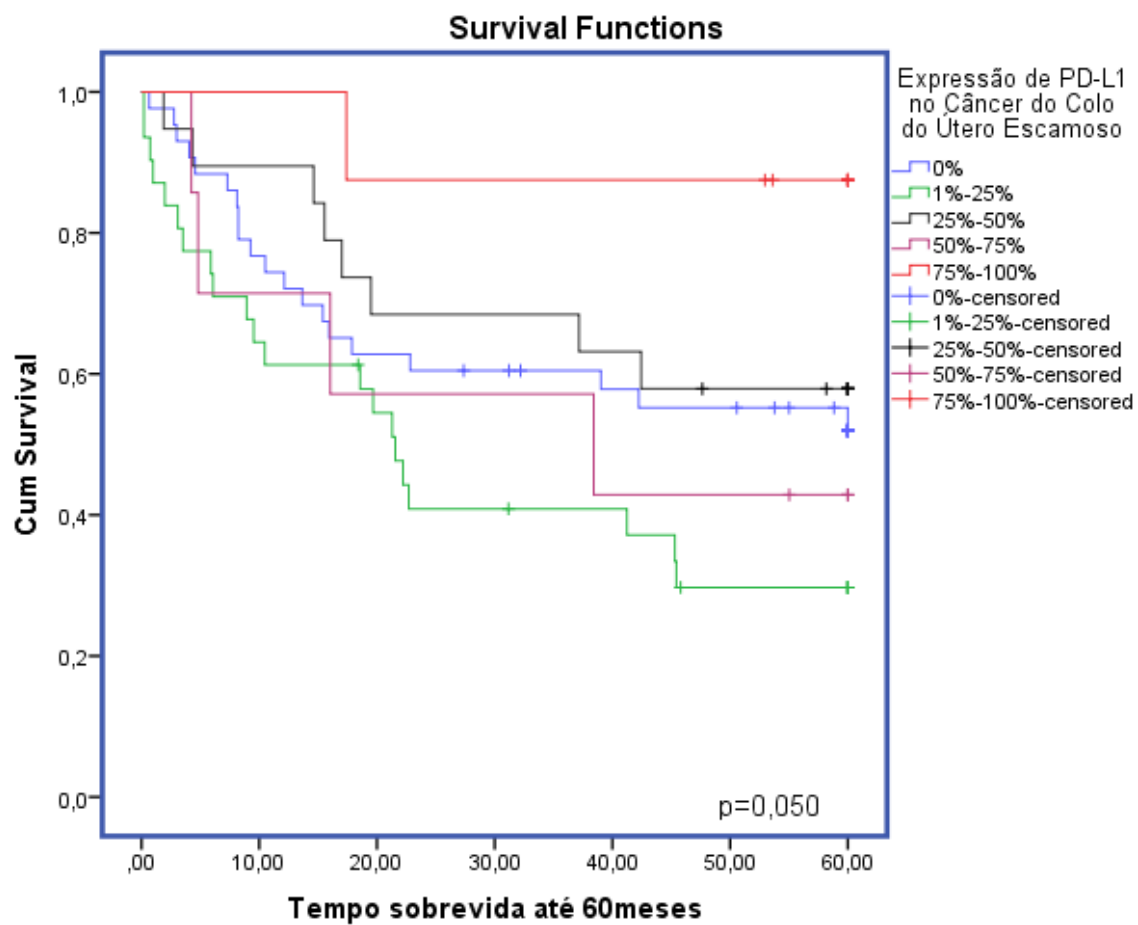


Figura 6.3: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses por categoria de expressão de PD-L1 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo escamoso.

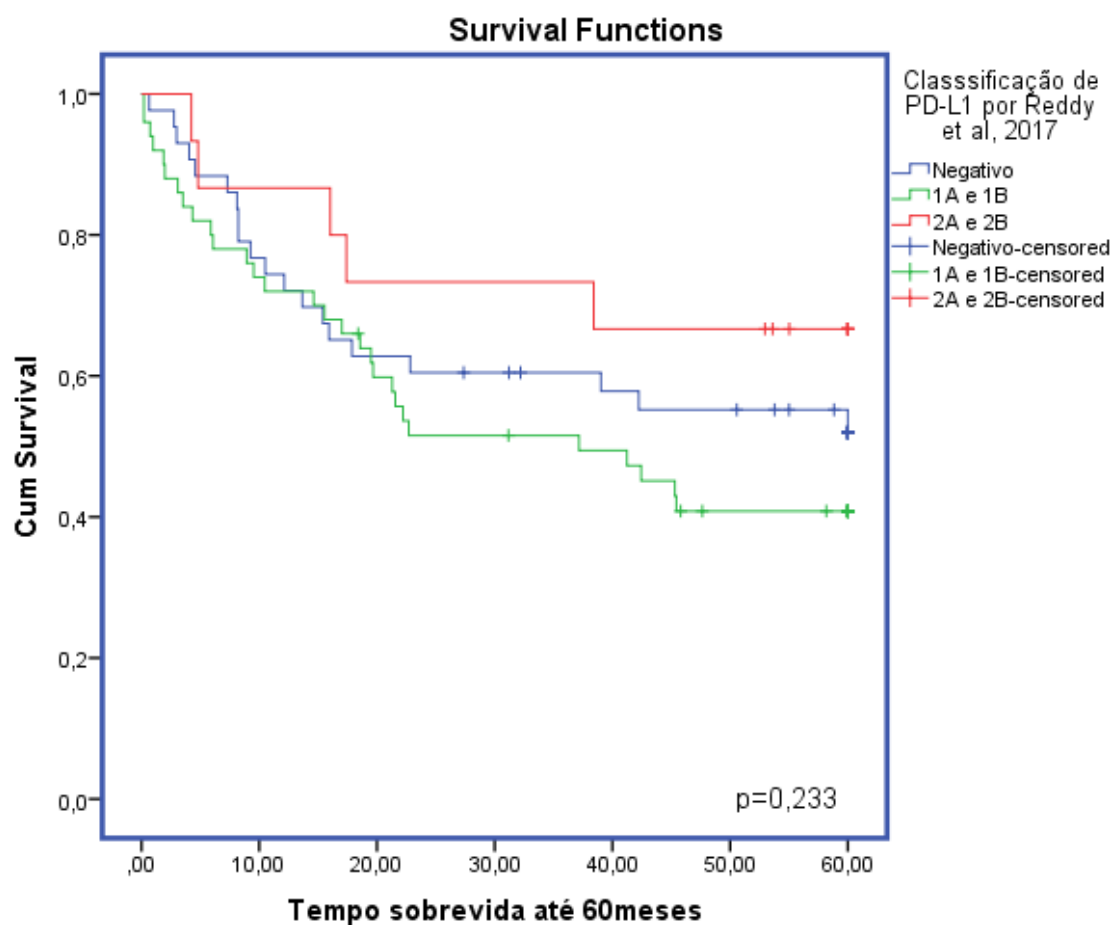


Figura 6.4: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses pela classificação de Reddy et al, 2017 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo escamoso.

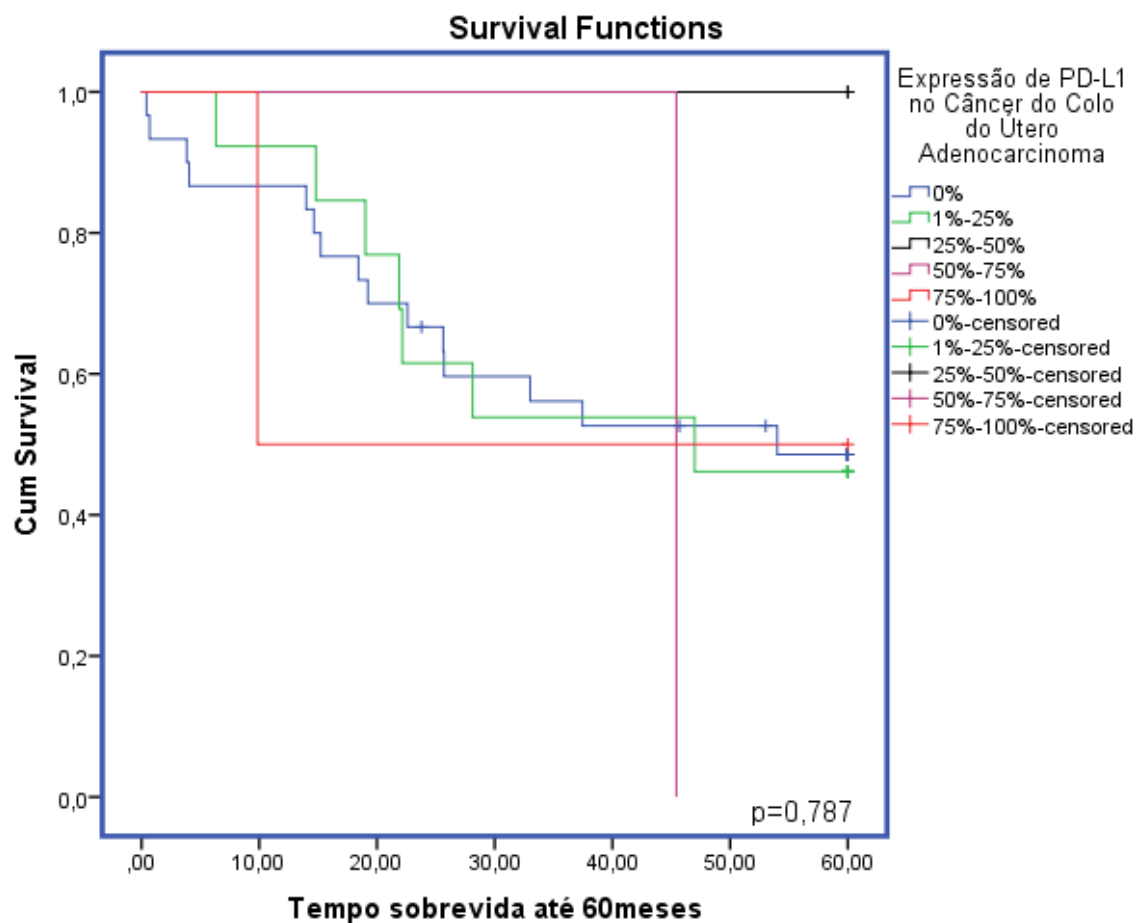


Figura 6.5: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses por categoria de expressão de PD-L1 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma.

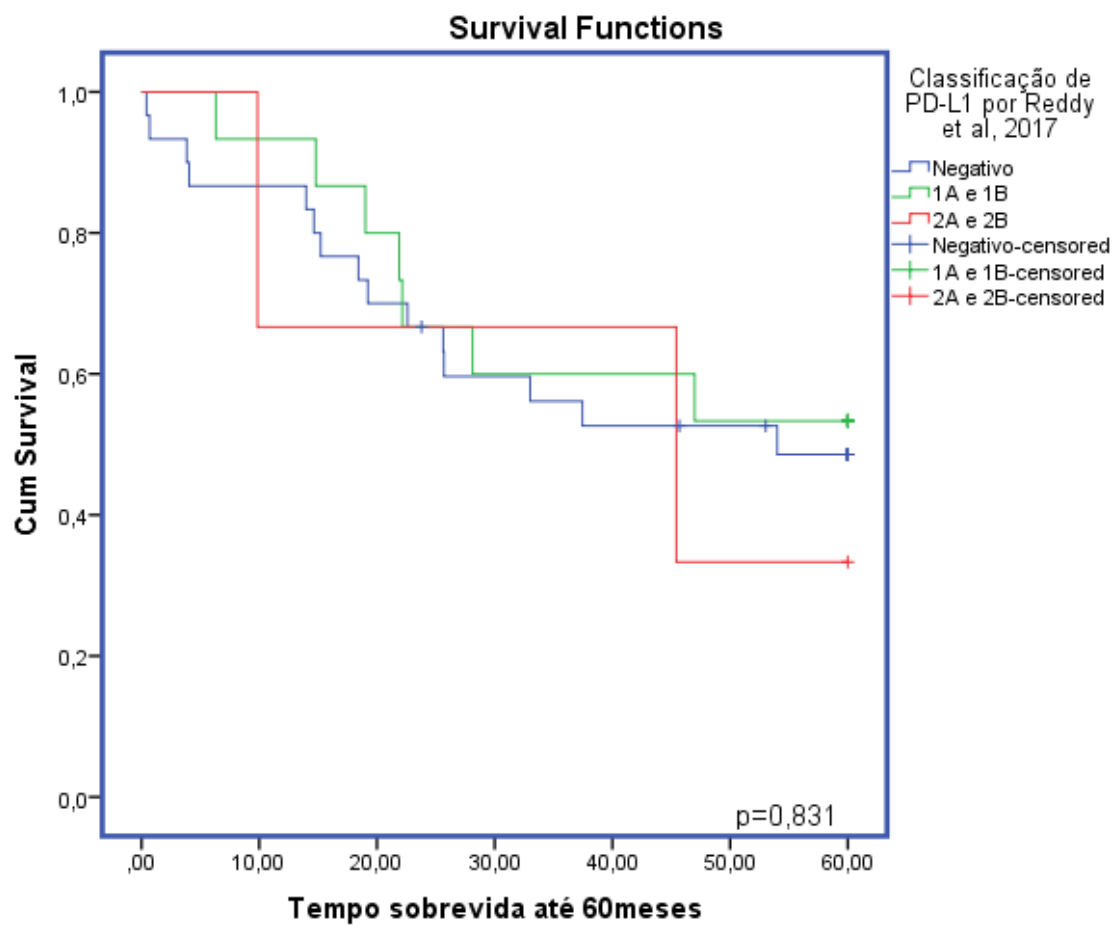


Figura 6.6: Curvas de Kaplan Meier de sobrevida em 60 meses pela classificação de Reddy et al, 2017 em pacientes com câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma.

7 DISCUSSÃO

As perguntas centrais deste estudo eram se a população de CC apresentava mutação do EGFR e se havia padrão de expressão do PD-L1 nas células tumorais. Esses resultados ajudarão a responder se um subgrupo desses pacientes pode se beneficiar com a terapia-alvo anti-EGFR e imunoterapia anti-PD-L1.

O projeto atual alcançou quatro principais resultados: 1) não se encontrou padrão de mutação de EGFR nos casos de CC; apenas um caso isolado apresentou mutação; 2) observou-se positividade de expressão de PD-L1 no CC; e 3) verificou-se alta discordância de positividade entre as amostras da mesma peça tumoral de um mesmo paciente; 4) as classificações usadas para a expressão de PD-L1 não são preditivas de sobrevida.

Além dos resultados principais, também foi verificado: 1) diferença epidemiológica, demográfica e morfológica entre CCA e CCE.

7.1 EGFR

O bloqueio da via molecular do receptor EGF é possível alvo no tratamento contra o câncer. No CC, a superexpressão do EGFR está presente em 54-71% dos pacientes e essa proteína mostrou associação com a resistência à quimioterapia citotóxica e com a resistência à radioterapia em câncer de células escamosas (KIM; PARK; KIM, 2002; TSAI; CHEN, 2004; NOORDHUIS et al., 2009; BUMRUNGTHAI et al., 2015) e, especificamente, ao prognóstico e à agressividade tumoral (CHO et al., 2003; GAFFNEY et al. 2003; LEE et al., 2004). Mas, apesar da superexpressão, as terapias anti-EGFR não obtiveram resultados promissores.

O cetuximab, um anticorpo anti-EGFR usado no esquema de tratamento oncológico, no CC, não conseguiu resultar em resposta clínica quando estudado em pacientes com doença recorrente ou persistente (PÉREZ-REGADERA, 2011). Avaliou-se também esse anticorpo em conjunto com dois inibidores de tirosina quinase anti-EGFR, gefitinib e erlotinib, em estudos diferentes, nos ensaios de fase II e o resultado não foi positivo como esperado. Resistência adquirida à essa terapia foi atribuída à desregulação da internalização ou degradação do EGFR, ativação ErbB2 e ErbB3 e aumento da sinalização de tirosinas quinases receptoras alternativas (LONGORIA; TEWARI, 2015).

Diante do dilema da superexpressão do EGFR e da não resposta terapêutica às terapias-alvo anti-EGFR, a hipótese de que apenas pacientes que apresentassem mutação no EGFR poderiam, talvez, se beneficiar dessas terapias surgiu. Alguns poucos estudos (ARIAS-PULIDO, 2008; IIDA, 2011; EL HAMDANI, 2010; SCHILDER, 2009; WOODWORTH, 2011) iniciaram a busca da mutação do EGFR, mas repostas definitivas não foram encontradas, já que os estudos demonstravam resultados divergentes.

Além de apenas um número limitado de pesquisas estarem investigando a mutação de EGFR no CC, a maior parte relata não ter descoberto mutação em nenhuma das amostras avaliadas (ARIAS-PULIDO, 2008; IIDA, 2011; EL HAMDANI, 2010; SCHILDER, 2009; WOODWORTH, 2011). Contudo, um estudo revelou a detecção de um subgrupo de pacientes que apresentou mutação no EGFR (Wright et al., 2012), e nos resultados preliminares apresentados no encontro anual da ASCO 2012, descrevem a mutação do EGFR em nove dos 25 casos de CCE avaliados (36%); e, em 2013, Wrigth et al. (2013) publicaram o resultado final com apenas 3,8% de mutação do EGFR no CC. Com efeito, não foi encontrado, até o momento, mutação do EGFR em CCA.

Wright et al. (2013), no seu trabalho final, avaliaram possíveis mutações em 80 CC, sendo 40 CCE e 40 CCA. Com relação ao EGFR, três amostras, 3,8% da sua população apresentou mutação, sendo todas presentes nos casos de CCE. Não houve mutação entre os casos de CCA. As mutações foram encontradas no éxon 15, que não representa os éxons envolvidos no domínio tirosina quinase. O complexo tirosina quinase é representado nos éxons 18 até 21 do EGFR, exatamente o que foi investigado no estudo vigente. A mutação encontrada por Wright et al. (2013) foi decorrente do uso da técnica de sequenciamento completo, em que toda a extensão do gene é analisada em busca de alterações. Com isso, levando em conta que a mutação verificada por Wright et al. (2013) não se encontra nos éxons 18-21, ao compararmos com o nosso estudo, podemos concluir que não houve mutação compatível com a nossa investigação. Semelhante aos resultados do presente estudo, Xiang et al. (2015) investigaram a mutação de 16 oncogenes, incluindo o EGFR (éxons 18-22) pela técnica de sequenciamento completo. Dos 179 casos de CCE, uma mutação foi encontrada, mas nenhuma entre os 62 casos de CCA. Li et al. (2015) realizaram sequenciamento completo de éxons em 23 CC e não encontraram

nenhuma mutação no EGFR. Zhang et al., em 2015, analisaram 293 casos de CCE em busca de mutações nos éxons 18-21 do EGFR e todos os resultados foram negativos.

7.2 Polimorfismos no EGFR

Wright et al., (2012) incluíram as mutações sinônimas (polimorfismos) nos resultados iniciais, o que foi melhor explanado nos resultados finais e no artigo publicado, apresentando com apenas 3,8% de mutações não sinônimas. Apesar de Qureshi et al. (2016) terem encontrado mutações em 31 pacientes em uma amostra com 95 CCE (32.63 %); 23 eram substituições de bases que não alteravam o aminoácido e oito são substituições de bases que modificam o aminoácido; com isso, pôde-se considerar que, com os critérios usados, oito de 95 (8,4%) eram mutações reais. Entre elas, uma ocorreu no éxon 19 e sete no éxon 21. Realizou-se esse estudo com pacientes de origem Indiana e com material fresco (não foram usados cortes de parafina). O DNA foi extraído diretamente do espécime conservado a -80°C. O resultado encontrado por Qureshi et al. (2016) pode ter sido levemente diferente do encontrado por conta dessas três diferenças: a população, a qualidade e a integralidade do DNA usado.

Desde o início do atual projeto, algumas pesquisas também tentaram responder à pergunta sobre a presença e a prevalência da mutação do EGFR no CC, ressaltando o valor real dessa questão (IIDA et al., 2011; WRIGHT et al., 2012, 2013). Todos os resultados nesse intervalo de tempo comprovaram uma baixa taxa de mutação (0,0% até 8,4%) (ARIAS-PULIDO, 2008; IIDA, 2011; EL HAMDANI, 2010; SCHILDER, 2009; WOODWORTH, 2011). Apesar de 0,78% de mutação ser considerado um resultado negativo, a pesquisa vigente está na mesma direção dos estudos mundiais e é peça-chave para a conclusão de que o CC não apresenta taxas de mutação de EGFR significativas.

Com relação à discussão da terapia-alvo, a ausência em mutações consistentes no domínio tirosino quinase do receptor EGF do CC pode explicar o insucesso de terapias-alvo contra esse receptor. A ausência de mutações EGFR faz a resposta a inibidores-alvo improvável.

7.3 PD-L1 no câncer do colo do útero

Assim como demonstrado na pesquisa vigente e de acordo com a literatura, apesar de CCE e CCA acometerem a mesma região anatômica, esses dois tipos apresentam aspectos epidemiológicos e clínicos não similares, mutações oncogênicas únicas, ambientes tumorais diferentes e morbimortalidades distintas (SPAANS et al., 2012; SAMUELS et al., 2015; PUNT et al., 2015). Por conta disso, analisou-se a expressão do PD-L1 separadamente nos casos de CCE e CCA.

7.4 Expressão de PD-L1

A investigação da expressão da proteína PD-L1 pelas células tumorais é recente no CC e ainda não existe um padrão de avaliação estabelecido. Diante do que se tem até hoje, alguns autores já avaliaram a expressão do PD-L1 no CC (HEEREN et al., 2016), mas só Reddy et al. (2017) propuseram uma classificação que leva em consideração a percentagem e a intensidade da marcação.

Heeren et al. (2016) consideraram PD-L1 positivo quando expresso em mais de 5% das células malignas e, nesse caso, eles encontraram 54% de positividade em CCE e 14% em CCA. Na população do INCA, ao usar essa classificação, foram encontrados 50% de positividade em CCE e 16,7% em CCA, sendo condizente com o valor na literatura. No estudo de Reddy et al. (2017), a positividade foi considerada quando presente em qualquer percentagem (>0%); sendo classificada em três grupos: 0 como negativo; 1A e 1B como fracamente positivos; e 2A e 2B como positivos; a expressão de PD-L1 foi de 26,9%, 38,7% e 34,3%, respectivamente. No presente estudo, ao utilizar a mesma classificação, foram encontrados 46,8% negativos, 41,7% fracamente positivos e 11,5% positivos; ou seja, observou-se mais casos de PD-L1 negativos. Vale ressaltar que os casos da coorte de Reddy et al. (2017) são diferentes dos casos estudados, pelo fato de eles terem, proporcionalmente, menos casos de CCA (que tem uma positividade menor de PD-L1), aumentando a positividade global em seu estudo. Fazem parte do estudo de Reddy et al. (2017) 12,9% de CCA; enquanto, no estudo atual, 30,4% são casos de CCA. Além disso, sete casos de adenocarcinoma escamoso foram incluídos pelos autores, os quais não estão representados nesse trabalho. Mas, mesmo levando em conta essas diferenças,

definitivamente, a população apresentou positividade maior do que a aqui apresentada, 73,0% *versus* 53,2%.

Mezache et al. (2015) avaliaram apenas casos de CCE e verificaram 51% (36/70) de positividade, definida como $\geq 10\%$. Como o ponto de corte em 10% não foi padronizado no presente estudo, a única percentagem que pode ser comparada é a de $\geq 5\%$, que foi encontrada em 50% dos casos de CCE. Karim et al. (2009) encontraram 23% de positividade de PD-L1 em CCE e 8% em CCA, porém o trabalho foi realizado apenas com casos classificados como FIGO I e II. Vale ressaltar que a marcação de positividade de Karim et al. (2009) não foi claramente explicada.

Além da percentagem de expressão, Heeren et al. (2016) também avaliaram a localização da inflamação no tumor e observaram que, quando presente ao redor da célula tumoral, comparada à localização estromal, indicava pior sobrevida total e pior sobrevida livre de doença. Nos casos do INCA, apesar de não significante estatisticamente, verifica-se a mesma tendência. No CCE, o risco de óbito em cinco anos dos pacientes que apresentam inflamação intra e peritumoral é 2,59 vezes maior do que nas pacientes com padrão de inflamação a estromal; já no CCA esse risco é de 1,68.

7.5 Intensidades da expressão do PD-L1

Outro desafio é a padronização de um *score* de avaliação da expressão e intensidade de PD-L1. Na literatura, a maioria dos artigos leva em conta apenas uma variável, a expressão do PD-L1 em percentagem de células coradas na IHQ. Uma outra forma de classificação do PD-L1 é mensurar a sua intensidade de expressão, conforme apresentado por Reedy et al. (2017). Existem protocolos usados para avaliação da IHQ de proteínas difusamente investigadas na oncologia como HER2neu (WOLFF et al., 2014) que levam em consideração essas duas variáveis (quantidade e intensidade) e o resultado de sua aferição está diretamente ligada à classificação e ao tratamento do câncer correlato. Ao se vislumbrar a importância dessa classificação baseada em mais de um elemento na IHQ do PD-L1, exploraram-se esses dois aspectos no CC, a intensidade e a percentagem da positividade de PD-L1. De acordo com a Figura 6.1 e 6.2, a intensidade foi considerada negativa, fraca, moderada e acentuada e, entre os casos positivos de CCE, ocorreu em 60,0%, 33,9% e 6,1%,

respectivamente; e em 83,3%, 16,5% e 0,0% no CCA. Ao se comparar a percentagem e a intensidade, percebe-se que, no CCE, só amostras com >50% de PD-L1 positivos apresentaram intensidade acentuada, representando 26,6% desse subgrupo, e intensidade fraca e moderada representaram 26,6% e 46,8, respectivamente. Em contraste, em 70% das amostras com PD-L1, <50% apresentaram intensidade fraca. No CCA, nenhuma amostra apresentou intensidade acentuada, mas precisa-se levar em consideração que apenas uma amostra apresentou percentagem >50% de expressão de PD-L1. A intensidade da expressão de PD-L1 apresentou-se estatisticamente distinta entre CCE e CCA, mas não demonstrou associação com desfecho. Isso pode ter sido pelo fato de apenas quatro casos de CCE apresentarem intensidade acentuada e não obterem poder estatístico para traçar conclusões.

7.6 Heterogeneidade

Outro tópico de suma importância é a presença de heterogeneidade intratumoral. Essa é uma discussão que engloba vários marcadores que são avaliados por meio de IHQ e principalmente quando se usa a técnica em TMA. HER-2 é uma das principais discussões na literatura e sua heterogeneidade intratumoral já foi comprovada em diversos trabalhos (OHLSCHEGEL et al., 2011; VANCE et al., 2008; ZARDAVAS et al., 2015). A heterogeneidade intratumoral se caracteriza pela diversidade de expressão de uma determinada proteína em uma mesma amostra tumores de um paciente. A pergunta mais valiosa é saber qual o tamanho da amostra pode representar o todo. Na verdade, deve-se levar em consideração que o todo tumoral não é uniforme e que variações podem ocorrer. Mas é realmente válido entender o quanto essa inconsistência pode influenciar na leitura da expressão de proteínas, indicação de tratamento-alvo e resposta ao tratamento. Na literatura, o trabalho vigente foi o primeiro que avaliou heterogeneidade no CC: 11,1% no CCE e 4,0% no CCA.

No câncer de pulmão, que já tem o uso estabelecido de tratamento anti-PD-L1 baseado na sua expressão na membrana das células tumorais avaliadas por IHQ, alguns trabalhos investigaram uma possível heterogeneidade intratumoral pelo fato de a resposta ao tratamento anti-PD-L1 também ser atingida em pacientes classificados como PD-L1 negativos (KERR et al., 2015; MANSFIELD et al., 2015; SHENG et al., 2016). Rehman et al. (2017) avaliaram a diferença intramural, tomando

como base lâminas extraídas diretamente de blocos cirúrgicos com no mínimo 1cm³ de células malignas, e encontraram 6% de discordância entre blocos, concluindo que houve baixa heterogeneidade intratumoral. Mas, ao compreender que, na população de CC, a maioria dos pacientes apenas realiza biópsia cervical, não havendo disponibilidade de peça cirúrgica com oferta de material maligno suficiente para uma análise padrão de 1cm³, essa questão é de suma importância. Com isso, a avaliação da expressão do PD-L1 em amostras de CC com tamanho e quantidade de tecido ideal está fora da realidade na prática médica. Na maior parte, o que se tem no CC é amostra de biópsia com material restrito.

Na literatura, não está disponível nenhum trabalho científico avaliando heterogeneidade intratumoral nos casos de CC. Como não há base bibliográfica em biópsias de CC, propõe-se equiparar a técnica de TMA utilizada na pesquisa vigente com biópsias em outros tipos tumorais. Mesmo extrapolando a comparação para outros cânceres, a literatura disponível é limitada. McLaughlin et al. (2016) avaliaram o material de câncer de pulmão colocados em TMA e verificaram heterogeneidade entre as amostras do mesmo tumor. Dill et al. (2017) tiveram como alvo o câncer de mama e a expressão de PD-L1 e relataram que encontraram heterogeneidade entre as amostras, ressaltado que uma maior inconsistência estava presente em cortes com <50% de expressão de PD-L1.

Como visto anteriormente, na população atual, a heterogeneidade esteve presente em 11,1% de CCE e 4,0% de CCA; mas, ao aprofundar a análise desse resultado, verificou-se que a divergência intratumoral pode ser um problema grande. Vale ressaltar que pelo menos uma amostra negativa para PD-L1 foi encontrada em nove dos 18 casos de CCA que apresentaram positividade na média nos demais cortes da mesma amostra. Ou seja, nove dos 18 casos de CCA considerados positivos apresentaram cortes sem expressão de PD-L1 no grupo de dois ou três cortes do mesmo tumor. Resumindo, 50% dos casos de CCA que apresentaram positividade de PD-L1, tinham pelo menos um corte negativo. O mesmo aconteceu com as amostras de CCE, 13 dos 65 casos positivos para PD-L1 apresentaram pelo menos um corte negativo.

Apesar de a heterogeneidade, pela definição estabelecida, não ser alta, é alarmante a quantidade de casos (50% no CCA e 20% no CCE) que apresentam pelo menos um corte negativo em meio a cortes positivos da mesma amostra. Pode-se

detectar esse fenômeno na maior parte em amostras fracamente positivas, mas foi observado também em amostras com mais de 25% de positividade. Com isso, pode-se concluir que a heterogeneidade de expressão de PD-L1 está presente no CC e é alta nessa população. Por conta desse achado, pode-se afirmar que algumas biópsias negativas podem ser de fato uma falsa representatividade do todo tumoral. Uma solução possível é a análise mais extensa das amostras que obtiveram negatividade na TMA, com uma avaliação de pelo menos dois cortes do mesmo tumor e, quando possível, três cortes em amostras de biópsias (material restrito) ou, quando viável, avaliação do bloco inteiro de amostras cirúrgicas, que proporcionam mais material para análise. Esse achado corrobora os resultados nos testes clínicos em que, mesmo em amostras negativas, as medicações anti-PD-L1 apresentam resultado positivo; a hipótese é de que essas amostras negativas não representam a verdade do tumor como um todo.

7.7 Fisiopatologias do HPV e PD-L1

Virtualmente, 100% dos casos de CC apresentam infecção por HPV. Mezache et al. (2015) verificaram a positividade de PD-L1 em três grupos: cérvix sem patologia ou infecção por HPV, CIN e CC; e encontraram PD-L1 negativo no primeiro grupo, 95% de positividade no segundo grupo e 51% de positividade no terceiro grupo, sugerindo que a infecção ativa pelo HPV possa potencializar a expressão de PD-L1. Yang-Chun et al. (2017) também investigaram a relação viral com a proteína PD-L1, mas usaram três grupos um pouco diferentes: cérvix sem patologia ou infecção por HPV, cérvix sem lesão, mas com HPV positivo e NIC (HPV positivo) e encontraram positividade crescente, respectivamente, nesses três grupos. Essa hipótese também foi levantada por outros pesquisadores (WANG et al., 2014; KATAOKA et al., 2016; LIU et al., 2016) que propuseram que não é apenas a presença do HPV que estimula a expressão de PD-L1, mas sim quando ele se integra ao DNA das células cervicais levando a lesões citológica que agem no mecanismo da proteína de ligação. Os detalhes por trás desse achado necessitam ser mais explorados, mas algumas teorias já existem, e uma delas é de que o HPV genômico se integra ao DNA celular ou ao redor do gene locus do PD-L1, o que provocaria um desajuste na região 3'-UTR do gene PD-L1, induzindo à sua expressão. Outras sugestões são: indução direta de PD-

L1 pelo RNA do HPV e desregulação do padrão de expressão do miRNA pelo HPV, sendo o E7 importante nesse mecanismo, o que afetaria a produção do PD-L1 na membrana celular (WANG et al., 2014; KATAOKA et al., 2016; LIU et al., 2016).

Elucidar esse mecanismo é de grande importância para uma melhor prevenção, diagnóstico e tratamento do CC. O trabalho atual corrobora a importância do PD-L1 em um câncer que é predominantemente causado pelo HPV. A expressão de PD-L1 em células malignas não é apenas decorrente da influência do HPV, por isso que se verifica a sua presença em diversas malignidades que não sofrem influência viral como, por exemplo, nos cânceres renal, pulmonar, colorretal, mama e melanoma (Konishi et al. 2004; Taube et al. 2014; Thompson et al. 2004; Massi et al. 2014; Wu et al. 2015). Mas, ainda é obscura a diferença da importância da presença viral na fisiopatologia da expressão do PD-L1 e suas consequências para o tratamento e o desfecho (DILL et al., 2017; MITTENDORF et al., 2014). Esforços nesse caminho devem ser incentivados por se tratar de um tema rico e pouco explorado.

7.8 PD-L1 e desfecho

Ao avaliar a expressão e intensidade de PD-L1 no CC com sobrevida, verificou-se uma ausência de associação.

Uma meta-análise recente e abrangente, por conta de algumas informações divergentes na literatura, incluiu ensaios clínicos com diversos tipos de tumor PD-L1 positivos e avaliou a relação entre a expressão dessa proteína e o desfecho dos pacientes após receberem terapia anti-PD-L1. Hamanish et al. (2007) avaliaram PD-L1 no câncer de ovário, Hino et al. (2010) no melanoma, Mu et al. (2011) no câncer de pulmão, Thompson et al. (2006) no câncer renal e Hsu et al. (2010) no carcinoma nasofaríngeo e todos relacionaram a expressão do PD-L1 com o desfecho desfavorável dos pacientes. Por outro lado, Massi et al. (2014), Konishi et al. (2004), Taube et al. (2014), Thompson et al. (2004), e Wu et al. (2015) avaliaram a relação do PD-L1 com os tumores de pulmão, renal e melanoma e encontraram resultados inconclusivos com relação à associação da presença de PD-L1 e o desfecho, e sugeriram um melhor resultado desses pacientes com o uso de anti-PD-L1. Na meta-análise acima relatada, na qual foram compilados todos os artigos aqui citados,

verificou-se que a presença da expressão de PD-L1 esteve relacionada a uma melhor morbimortalidade, quando comparada a casos PD-L1 negativos.

No CC, poucos artigos avaliaram essa associação. Heeren et al. (2016) não encontraram associação entre PD-L1 e sobrevida. Karim et al. (2009) também relataram não terem observado essa influência. No estudo vigente essa associação também não foi encontrada. Isso indica que, aparentemente, independente da expressão de PD-L1 os pacientes com CC podem se beneficiar das terapias-alvo contra PD-L1, já que expressa amplamente essa proteína em suas células cancerígenas. A expressão no CCA foi menos do que no CCE. Acredita-se que, na população de CCA, a expressão de PD-L1 não confere significado prognóstico, mas não deixa de ser um alvo potencial para o tratamento e possível resposta favorável. Com isso, os pacientes com CC e expressão acentuada de PD-L1 tumoral são fortes candidatos à terapia-alvo, sendo elevadas as expectativas de resultados favoráveis.

Vale ressaltar que, apesar da associação entre PD-L1 e o desfecho ser controversa, o tratamento anti-PD-L1 tem trazido benefícios para essa população (FRENEL et al, 2016; BORCOMAN; LE TOURNEAU, 2017).

7.9 PD-L1 e terapia-alvo

Para melhorar o prognóstico do CC, novas imunoterapias devem ser desenvolvidas e estabelecidas. O CC em estágio inicial pode ser curado com cirurgia, enquanto a quimiorradiação simultânea é o tratamento de escolha para estágios localmente avançados. Pacientes com câncer recorrente ou metastático têm, no entanto, opções de tratamento limitadas. O uso de regimes de quimioterapia à base de cisplatina tem sido relatado como a escolha mais ativa no tratamento de primeira linha para CC avançado. Apesar disso, a SG mediana dessa população de pacientes apenas excede em um ano a população de pacientes que não usou cisplatina, com respostas de curta duração e rápida deterioração da qualidade de vida (MONK et al., 2009). O bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado dirigido ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), definido como um agente antiangiogênico, foi sugerido em combinação com quimioterapia como terapia de primeira linha, com uma melhoria de SG estatisticamente significativa em comparação à quimioterapia como regime único (MONK et al., 2009). Não existem opções de tratamento validadas

além desse regime de tratamento de primeira linha. Os regimes de quimioterapia, nessa situação, estão associados à toxicidade substancial e à pouca eficácia, com média de SG de sete meses (TEWARI et al., 2014). Em vários estudos de fase II publicados e comparados na revisão de literatura de Boussios, S. G. et al. (2016), avaliando agentes de quimioterapia isolados na segunda linha, incluindo topotecano, vinorelbina, gemcitabine, docetaxel e pemetrexed, a taxa de resposta variou entre 4,5% e 18%, com uma sobrevida sem progressão e SG variando entre 2-5 e 5-16 meses, respectivamente. A cisplatina ainda é uma opção como agente único em CC recorrente ou metastático com uma taxa de resposta geral variando entre 13% e 23% (BOUSSIOS et al., 2016). Novos tratamentos efetivos são, portanto, necessários. A imunoterapia representa um avanço nos últimos anos na oncológica, com atividade antitumoral alcançada com inibidores de pontos específicos tumorais que provocam a mobilização da resposta imunológica a diversos tipos de tumores.

As terapias imunológicas promissoras dirigidas a moléculas de ponto de controle imune, como a CTLA-4 e a PD-1 expressa em células T ativadas, contrariam o ciclo imunossupressor prevaente no microambiente do tumor e levam a respostas clínicas completas e duradouras (PENNOCK et al., 2015; SHARMA et al., 2015). Duas medicações anti-PD-L1 estão aprovadas atualmente, o nivolumab e o pembrolizumab, que têm indicação de uso no câncer colorretal metastático, no de cabeça e pescoço, recorrente ou metastático, no linfoma de Hodgkin clássico que recaiu ou progrediu, no melanoma não ressecável ou metastático, no câncer de pulmão de células não pequenas metastático ou progressivo, no câncer de células renais avançado e no carcinoma urotelial localmente avançado ou metastático. Os anti-PD-L1 atezolizumab, avelumab e durvalumab estão em estudo e têm indicações bem restritas até o momento. Apesar de nenhuma medicação ter sido aprovada até o momento para o uso no CC, ensaios clínicos estão em andamento. A terapia anti-PD-L1 tem sido associada a um melhor resultado de sobrevivência em vários tipos de câncer, incluindo os cânceres de pulmão, melanoma, câncer de células renais e câncer de bexiga (HERBST et al., 2014; POWLES et al., 2014). Atualmente, no CC avançado, os ensaios clínicos de fases I e II estão em andamento examinando os efeitos do pembrolizumab, ipilimumab, nivolumab e tremelimumab; no entanto, nenhum estudo apresentou resultados finais no CC (SANTINI et al. 2014; FRIEDMAN C. 2016; LEEUWEBHOEK A. V. 2017; ROMANO e. et al 2017).

O estudo NCT02054806 (ALLEY et al., 2017; OTH et al., 2017c), que investigou o uso do anti-PD-L1 pembrolizumab em diversos tumores sólidos, até agora publicou alguns artigos demonstrando que, em pacientes com carcinoma de canal anal avançado, mesotelioma pleural, endometrial (OTH et al., 2017b), pulmonar (OTH et al., 2017a) e nasofaríngeo (HSU et al., 2017) com PD-L1-positivos, o pembrolizumab demonstrou um perfil de segurança gerenciável e incentivou a atividade antitumoral. Apresentaram-se resultados preliminares (FRENEL et al, 2016) desse estudo em CC no encontro anual ASCO 2016, ressaltando que o pembrolizumab foi bem tolerado e mostrou atividade antitumoral em pacientes com CCE avançado e PD-L1 positivo e com a perspectiva de que o benefício clínico do pembrolizumab no câncer cervical avançado seria investigado mais a fundo no teste KEYNOTE-158 da fase 2 (NCT02628067) (FRENEL et al, 2016). Aguarda-se o resultado final desse ensaio clínico para conclusões mais contundentes baseadas em evidências fortes. Recentemente, publicou-se um relato de caso promissor com uso de pembrolizumab em CC com expressão PD-L1 positiva onde os autores relatam que o mesmo foi usado em uma paciente com CCE que teve recorrência do tumor após sete anos do tratamento com quimiorradioterapia padronizada, apresentando uma diminuição dramática do tumor após o tratamento com pembrolizumab (BORCOMAN; LE TOURNEAU, 2017).

O estudo NCT02488759 (HOLLEBECQUE et al, 2017), que está em andamento, avalia o uso de nivolumab em cânceres ginecológicos associados ao HPV e inclui o CCE. Na ASCO 2017 foi apresentado o resultado parcial desse estudo clínico onde demonstrou-se resposta clínica encorajadora e um perfil de segurança gerenciável em pacientes com CCE, apoiando a continuação do estudo. Vale ressaltar que esse resultado foi independente do perfil de expressão de PD-L1.

Provocantemente, alguns autores (AGUIAR et al., 2016) relatam resultados positivos com terapias anti-PD-L1 em pacientes que não expressam PD-L1 em sua membrana tumoral. Entre os carcinomas, em que observou-se esse desfecho, estão os cânceres de pulmão, renal, gástrico, mama e melanoma. É sugerido que essa resposta se deva a alguns fatores: 1) heterogeneidade do tumor (discutido previamente); 2) diferentes formas de leitura e padronização do PD-L1 (discutido previamente); e 3) diferentes plataformas de avaliação de PD-L1. As diferenças de plataformas de IHQ para PD-L1 são uma importante discussão na

literatura, já que ainda não existe uma padronização. Em artigos de meta-análise, esse problema também vem à tona. Gandini; Massi e Mandalà (2016), ao compararem a expressão de PD-L1 nos diversos artigos, verificaram o uso de três plataformas diferentes e leituras com padrões diversos e relataram que a IHQ de PD-L1 sofre uma falta de padronização e validação, uma vez que os anticorpos específicos da PD-L1 foram difíceis de desenvolver, resultando em ampla variabilidade nos tecidos frescos, congelados e em parafina. Além disso, a localização celular diferente (membranosa *versus* superfície celular *versus* citoplasmática) e a incerteza sobre o papel da expressão de PD-L1 em células imunes dentro do microambiente tumoral aumentam a complexidade para a interpretação de dados. Diferentes métodos e reagentes também podem contribuir para a variabilidade dos resultados na expressão de PD-L1 nos diversos conjuntos de dados. Apesar das crescentes informações sobre o PD-L1, ainda existem muitos desafios no tocante à padronização de plataformas de diagnóstico, da leitura da expressão do PD-L1, da definição de positividade e da localização da expressão de PD-L1. Os kits de diagnóstico PD-L1, baseados em IHQ em espécimes de biópsia tumoral estão atualmente sendo utilizados na estratificação de pacientes incluídos em ensaios clínicos que estão sendo avaliados para terapias anti-PD-1; no entanto, os pacientes cuja doença é PD-L1 negativa ainda podem obter benefícios clínicos e respostas objetivas de terapias anti-PD-L1

Apesar de não existir protocolo que inclua PD-L1 na avaliação e tratamento de CC ainda, pode-se vislumbrar isso em um futuro próximo, tendo em vista que, como apresentado, na população estudada, a positividade para PD-L1 é de 60,2% em CCE e 37,5% em CCA.

As principais limitações do estudo foram a perda das amostras na seleção inicial dos pacientes, a conservação inadequada do material e a não disponibilidade do material no arquivo do INCA no momento do estudo. Uma outra limitação foi a baixa qualidade das amostras

8 CONCLUSÃO

Ao final do trabalho os objetivos propostos foram alcançados:

- 1) Verificou-se padrão epidemiológico, demográfico e morfológico diferente nos CCA e CCE;
- 2) Apenas uma amostra do CCE (0,78%) apresentou mutação do EGFR no domínio tirosina quinase. Como a prevalência é muito pequena, os pacientes com CC não se beneficiariam da investigação compulsória dessa mutação.
- 3) Foi verificada considerável positividade de PD-L1 nos casos de CC (60,2% de CCE e 37,5% de CCA).
- 4) Houve alta taxa de divergência intratumoral na expressão de PD-L1, indicando a necessidade de avaliação extensa em casos negativos.
- 5) Não foi verificada associação entre expressão de PD-L1 e sobrevida.

9 REFERÊNCIAS

AGUIAR, P. N. Jr. et al. The role of PD-L1 expression as non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. **Immunotherapy**, London, v. 8, n. 4, p. 479-488, 2016.

AKERMAN, G. S. et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. **Cancer Research**, Baltimore, v. 61, n. 9, p. 3837–3843, 2001.

ALLEY, A. et al. Clinical safety and activity of pembrolizumab in patients with malignant pleural mesothelioma (KEYNOTE-028): preliminary results from a non-randomised, open-label, phase 1b trial. **Lancet Oncology**, London, v. 8, n. 5, p. 623-663, 2017.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. ACOG practice bulletin. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35, May 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, New York, v. 78, n. 1, p. 79-91, 2002.

AMIN, D. N. et al. HER3 signalling is regulated through a multitude of redundant mechanisms in HER2-driven tumour cells. **The Biochemical Journal**, London, v. 447, n. 3, p. 417-425, 2012.

ARIAS-PULIDO, H. et al. Absence of epidermal growth factor receptor mutations in cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, Cambridge, v. 18, p. 749–754, 2008.

BALTAZAR, F. et al. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor expressions in different histological subtypes of cervical carcinomas. **International Journal of Gynecological Pathology**, New York, v. 26, n. 3, p. 235–241, 2007.

BEREK, J. S. et al. Pelvic exenteration for recurrent gynecologic malignancy: survival and morbidity analysis of the 45-year experience at UCLA. **Gynecology Oncology**, New York, v. 99, p. 153-159, 2005.

BERRINGTON DE GONZÁLEZ, A.; SWEETLAND, S.; GREEN, J. Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, London, v. 90, n. 9, p. 1787-1791, 2004.

BOARDMAN, C. H. Cervical Cancer treatment and management. Updated: nov. 02, 2016. Available from: <<https://emedicine.medscape.com/article/253513-treatment>>. Access in: 16 jun. 2017.

BONNER J. A. et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. **N Engl J Med**; 354:567-578, 2006

BORCOMAN, E.; LE TORNEAU, C. Pembrolizumab in cervical cancer: latest evidence and clinical usefulness. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, London, v. 9, n. 6, p. 431-439, 2017.

BOUSSIOS, S. G. et al. Management of patients with recurrent/advanced cervical cancer beyond first line platinum regimens: where do we stand? A literature review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 108, p. 164–174, 2016.

- BRAHMER, J. R. et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 28, n. 19, p. 3167–3175, 2010.
- BUMRUNGTHAI, S. et al. Epidermal growth factor receptor pathway mutation and expression profiles in cervical squamous cell carcinoma: therapeutic implications. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 13, p. 244, 2015.
- BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, [Washington, DC], v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.
- BURGER, R. A. et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 88, n. 19, p. 1361-1368.
- BURUT M.U. et al. Analysis of Sensitivity, Specificity, and Positive and Negative Predictive Values of Smear and Colposcopy in Diagnosis of Premalignant and Malignant Cervical Lesions. **Med Sci Monit.** 10;21:3860-7, 2015.
- CANTRELL, L. A. et al. Survival outcomes for women undergoing type III robotic radical hysterectomy for cervical cancer: a 3-year experience. **Gynecology Oncology**, New York, v. 117, n. 2, p. 260-265, 2010.
- CHATURVEDI, A. K. et al. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 101, p. 1120–1130, 2009.
- CHEN D.; MELLMAN I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**. V. 39, issue 1, p.1-10, 2003
- CHESSON H.W. et al. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. **Sex Transm Dis.** 41(11):660-4, 2014
- CHO, N. H. et al. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 93, p. 346–353. 2003.
- DA CUNHA SANTOS, G.; SHEPHERD, F. A.; TSAO, M. S. EGFR mutations and lung cancer. **Annual Review of Pathology**, Palo Alto, v. 6, p. 49–69, 2011.
- DE CREMOUX, P. et al. Different outcome of invasive cervical cancer associated with high-risk versus intermediate-risk HPV genotype. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 124, n. 4, p. 778–782, 2009.
- DILL, E. A. et al. PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity across breast cancer subtypes and stages: an assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors. **The American Journal of Surgical Pathology**, New York, v. 41, n. 3, p. 334-342, 2017.
- DONG, H. et al. B7-H1, a third member of the B7 family, costimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nature Medicine**, New York, v. 5, n. 12, p.1365–1369, 1999.
- DOURADO, I. et al. Revisiting the use of condoms in Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 18, supl. 1, p. 63-88, 2015.

DRAKE, C. G.; JAFFEE, E.; PARDOLL, D. M. Mechanisms of immune evasion by tumors. **Advances in Immunology**, New York, v. 90, p. 51–81, 2006.

EIBLMAIER, M. et al. Correlating EGFR expression with receptor-binding properties and internalization of ⁶⁴Cu-DOTA-cetuximab in 5 cervical cancer cell lines. **Journal of Nuclear Medicine**, Chicago, v. 49, p. 1472–1479, 2008.

EL HAMDANI, W. et al. EGFR, p16INK4a and E-cadherin immuno-histochemistry and EGFR point mutations analyses in invasive cervical cancer specimens from Moroccan women. **Cellular and Molecular Biology**, Noisy-le-Grand, v. 56, n. 3, p. 1373-1384, 2010.

FARLEY, J. et al. Phase II study of cisplatin plus cetuximab in advanced, recurrent, and previously treated cancers of the cervix and evaluation of epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 121, p.303–308, 2011.

FRENEL, J. S. et al. Pembrolizumab in patients with advanced cervical squamous cell cancer: preliminary results from the phase Ib KEYNOTE-028 study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 34, Suppl., abstract 5515, 2016.

FRENEL, J. S. et al. Study of Pembrolizumab (MK-3475) in Participants With Advanced Solid Tumors (MK-3475-158/KEYNOTE-158) Available form: Clinicaltrials.gov 2015 <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02628067?recrs=ab&cond=nct02628067&rank=1t>> Access in: 04 dez. 2017

FRIEDMAN C. et al. Atezolizumab and Bevacizumab in Treating Patients With Recurrent, Persistent, or Metastatic Cervical Cancer Available form: Clinicaltrials.gov 2014 <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02921269?id=NCT02257528+OR+NCT02921269+OR+NCT03298893+OR+NCT02914470&rank=2&load=cart>> Access in: 04 dez. 2017

FUCHS, I. et al. The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma. **Anticancer Research**, Athens, v. 27, n. 2, p. 959–963, 2007.

GADDUCCI, A.; GUERRIERI, M. E.; GRECO, C. Tissue biomarkers as prognostic variables of cervical cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 86, n. 2, p. 104–129, 2013.

GAFFNEY, D. K. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, Elmsford, v. 56, p. 922–928, 2003.

GANDINI, S.; MASSI, D.; MANDALA. PDL1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in oncology/hematology**, Boca Raton, v. 100, p. 88-98, 2016

GE HEALTHCARE. **Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification KIT**. Buckinghamshire, 2008-2017. Available from: <http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1507141190972/litdoc28933585_20171004191946.pdf>. Access in: 12 fev. 2017.

GENTHER, S. M. et al. Quantitative Role of the Human Papillomavirus Type 16 E5 Gene during the Productive Stage of the Viral Life Cycle. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 5, p. 2832-2842, 2003.

GHORANI E. et al. Pembrolizumab is effective for drug-resistant gestational trophoblastic neoplasia. **Lancet**, v. 390(10110):2343-2345, 2017.

GIBNEY, G. T. et al. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. **Lancet Oncology**, London, v. 17, p. e542–e551, 2016.

GOLDBERG, G. L. et al. Total pelvic exenteration: the Albert Einstein College of Medicine/Montefiore Medical Center Experience (1987 to 2003). **Gynecology Oncology**, New York, v. 101, n. 2, p. 261-268, 2006.

GRAVITT, P. E.; WINER, R. L. Natural history of HPV infection across the lifespan: Role of viral latency. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 1–10, 2017.

GUSTAFSSON, I. et al. International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 71, n. 2, p. 159-165, 1997.

HAMANISHI, J, et al. Programmed cell death1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 9, p. 3360-3365, 2007.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, P. 646-674, 2011.

HEEREN, A. M. et al. Prognostic effect of different PD L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. **Modern pathology**, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 753-763, 2016.

HENGST, L.; REED, S. I. Inhibitors of the Cip/Kip family. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Heidelberg, v. 227, p. 25–41, 1998.

HERBST, R. S. et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. **Nature**, London, v. 515, n. 7528, p. 563–567, 2014.

HERTLEIN L. et al. Cetuximab monotherapy in advanced cervical cancer: a retrospective study with five patients. **Arch Gynecol Obstet**. V. 283(1):109-13, 2010.

HILDESHEIM, A. et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **The Journal of Infection Disease**, Chicago, v. 169, p. 235–240, 1994.

HINO, R. et al. Tumor cell expression of programmed cell death 1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. **Cancer**, New York, v. 116, p. 1757-1766, 2010.

HOVE, M. G. et al. Oncogene expression and microvessel count in recurrent and nonrecurrent stage Ib squamous cell carcinoma of the cervix. **Journal of Reproductive Medicine**, Chicago, v. 44, n. 6, p. 493–496, 1999.

HSU, C. et al. Safety and Antitumor Activity Programmed Death-Ligand 1-Positive Nasopharyngeal Carcinoma: Results of the KEYNOTE-028 Study. **Journal of**

Clinical Oncology, New York, Aug 24, JCO2017733675, 2017. doi: 10.1200/JCO.2017.73.3675.

HSU, M. C, et al. Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 23, p. 1393-1403, 2010.

HWANG, E. S.; NOTTOLI, T.; DIMAIO, D. The HPV-16E5 protein: expression, detection and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. **Virology**, New York, v. 211, n. 1, p. 227–233, 1995.

IIDA, K, et al. EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target, **British Journal of Cancer**, London, v. 105, n. 3, p. 420–427, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Estimativa_2012.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ESTIMATIVA 2016**. Distribuição proporcional do total de mortes por câncer, segundo localização primária do tumor, por sexo, localidade, por período selecionado. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo02/consultar.xhtml;jsessionid=26F9D8B8A0DCFD13A9B048EAAE044263#panelResultado>. Acesso em 10 jan.2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **GLOBOCAN 2012**: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 v1.0. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. IARC Cancer Base No. 11. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Pages/bar_sex_pop_prev_sel.aspx>. Access in: 15 Jan. 2017.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 120, n. 4, p. 885-891, 2007. Erratum in: International journal of cancer, New York, v. 120, n. 11, p. 2525, 2007, Berrington de González, Amy [removed]; Green, Jane [removed].

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **International**

Journal of Cancer, Genève, v. 118, p. 481–1495, 2006.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 120, p. 885–891, 2007.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 18, p. 1060–1069, 2009.

ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 3887–3895, 1992.

JIANG D. et al. The prognostic value of EGFR overexpression and amplification in Esophageal squamous cell Carcinoma. **BMC Cancer**. V.15:377, 2015

KANG, W. D. et al. HPV-18 is a poor prognostic factor, unlike the HPV viral load, in patients with stage IB-IIA cervical cancer undergoing radical hysterectomy. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 121, n. 3, p. 546–550, 2011.

KARIM, R. et al. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+T- cell infiltration infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. **Cancer Research**, Denville, v. 15, n. 20, p. 6341-6347, 2009.

KATAOKA, K. et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. **Nature**, London, v. 534, n. 7607, p. 402-406, 2016.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 26, p. 677–704, 2008.

KEIR, M. E. et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 203, n. 4, p. 883–895, 2006.

KERR, K. M. et al. Programmed Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? **Journal of Thoracic Oncology**, Hagerstown, v. 10, n. 7, n. 985-989, 2015.

KERSEMAEKERS, A. M. et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 5, p. 577–586, 1999.

KEYS, H. M. et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 15, p. 1154-61, 1999.

KIM, Y. T.; PARK, S. W.; KIM, J. W. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 87, p. 84-89, 2002.

KONISHI, J. et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its

relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clinical Cancer Research*, Denville, v, 10, p. 5094–5100, 2004.

KOSHIOL, J. et al. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *American Journal Epidemiology*, Baltimore, v. 168, n. 2, p. 123–137, 2008.

KOUTRAS, A. K. et al. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 74, n. 2, p. 73-78, 2010.

LAI, C. H. et al. Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 25, n. 24, 3628-3634, 2007.

LATCHMAN, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nature Immunology**, New York, v. 2, p. 261–268, 2001.

LAVENS N. et al. EGFR overexpression in squamous cell carcinoma of the penis. **Current Oncology**. V.17(1):4-6, 2010.

LEE L. Y.; GARLAND, S. M. Human papillomavirus vaccination: the population impact. **F1000Research**, London, v. 6, n. 866, eCollection 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473416/pdf/f1000research-6-11527.pdf>>. Access in: 02 fev. 2017.

LEE, C. M. et al. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 99, p. 415-421, 2005.

LEE, C. M. et al. Expression of HER2neu (c- erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 93, p. 209–214, 2004.

LEE H. J. et al. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. **British Journal of Cancer**. V. 112(1):103-111, 2015

LEEUWEBHOEK A. V. et al. Carboplatin-cyclophosphamide Combined With Atezolizumab (PROLOG). Available form: Clinicaltrials.gov 2014 <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02914470?id=NCT02257528+OR+NCT02921269+OR+NCT03298893+OR+NCT02914470&rank=3&load=cart>> Access in: 04 dez. 2017.

LIU, C. et al. Increased expression of PD-L1 by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein inhibits anticancer immunity. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 15, n. 3, p. 1083-1070, 2017.

LOMBARD, I. et al. Human papilloma-virus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 16, n. 8, p. 2613-2619, 1998.

LONG, H. J. et al. Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in

carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 23, n. 21, p. 4626-4633, 2005.

LONGATTO-FILHO, A. et al. Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma. **BMC Cancer**, London, v. 9. Available from: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2407-9-212?site=bmccancer.biomedcentral.com>>. Access in: 25 jan. 2017.

LONGORIA, T. C.; TEWARI, K. S. Pharmacologic management of advanced cervical cancer: antiangiogenesis therapy and immunotherapeutic considerations. **Drugs**, New York, v. 75, n. 16, p. 1853-165, 2015.

LOPES L. L.; VATTIMO E. F. Q.; JUNIOR G. C. Identificação de mutações ativadoras no gene EGFR: implicações no prognóstico e no tratamento do carcinoma pulmonar de células não pequenas. **J. bras. Pneumol**, São Paulo, v. 41 no.4, 2015

LOWE, M. P. et al. A multi-institutional experience with robotic-assisted radical hysterectomy for early stage cervical cancer. **Gynecology Oncology**, New York, v. 113, n. 2, p. 91-4, 2009.

MAHESH, S. Chemotherapy and biologic therapy for squamous cell cancers of head and neck. **Otorhinolaryngology Clinics: An International Journal**, New Delhi, v. 2, n. 1, p. 33-41, 2010. Available from: <<http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=418&Type=FREE&TYPE=TOP&IN=~eJournals/images/JPLOGO.gif&IID=43&isPDF=YES>>. Access in: 12 jan. 2017.

MALTA, M. et al. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 559-565, 2010.

MANSFIELD, A. S. et al. Heterogeneity of programmed cell death-ligand1 expression in multifocal lung cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 22, n. 9, p. 2177-2182, 2015.

MASSI, D. et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. **Annals of Oncology, Dordrecht**, v. 25, p. 2433–2442, 2014.

MCDERMOTT, D. F.; ATKINS, M. B. PD-1 as a potential target in cancer therapy. **Cancer Medicine**, [Malden, MA], v. 2, n. 5, p. 662-673, 2013.

MELLMAN I.; COUKOS G.; DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**. V. 480(7378):480-9, 2011.

MEZACHE, L. et al. Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 28, n. 12, p. 1594-1602, 2015.

MITTENDORF, E. A. et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. **Cancer Immunology Research**, Philadelphia, v. 2, n. 4, p. 361-370, 2014.

MONK, B. J. et al. Phase III trial of four cisplatin-containing doublet combinations in stage IVB, recurrent, or persistent cervical carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 27, n. 28, p. 4649-4655, 2009.

MONK B.J. et al. Phase II trial of bevacizumab in the treatment of persistent or

recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: A Gynecologic Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 27, n. 28, p. 1069-1074, 2009

MOORE, D. H. Chemotherapy for advanced, recurrent, and metastatic cervical cancer. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, Sudbury, v. 6, n. 1, p. 53-57, 2008.

MOORE, D. H. Phase III study of cisplatin with or without paclitaxel in stage IVB, recurrent, or persistent squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 22, n. 15, p. 3113-3119, 2004.

MOORE, K. N. et al. A comparison of cisplatin/paclitaxel and carboplatin/paclitaxel in stage IVB, recurrent or persistent cervical cancer. **Gynecology Oncology**, New York, v. 105, n. 2, p. 299-303, 2007.

MORRIS, M. et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 15, p. 1137-1143, 1999.

MU, C. Y. et al. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. **Medical Oncology**, Northwood, v. 28, n. 3, p. 682-688, 2011.

NAKANO, T. et al. Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. **Cancer**, New York, v. 79, p. 513–520, 1997.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Cervical Cancer** Version 1. 2016. Available at <http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cervical.pdf>. Accessed: January 21, 2017.

NEZHAT, F. R. et al. Robotic radical hysterectomy versus total laparoscopic radical hysterectomy with pelvic lymphadenectomy for treatment of early cervical cancer. **JSL: Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons**, Miami, v. 12, n. 3, p.227-237, 2008.

NGAN, H. Y. et al. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. **Tumour Biology**, Tokyo, v. 22, n. 1, p. 176–183, 2001.

NOGUEIRA-RODRIGUES, A. et al. Comparison of adenocarcinoma (ACA) and squamous cell carcinoma (SCC) of the uterine cervix in a sub-optimally screened cohort: a population-based epidemiologic study of 51,842 women in Brazil. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 135, n. 2, p. 292-296, 2014.

NOGUEIRA-RODRIGUES A. et al. An alert to Latin America: Current human papillomavirus vaccination trends highlight key barriers to successful implementation. **Cancer**. 123(12):2193-2199, 2017

NOORDHUIS, M. G. et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo) radiation and survival in cervical cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 15, p. 7389–7397, 2009.

OHLSCHEGEL, C. et al. HER2 genetic heterogeneity in breast carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 64, n. 12, p. 1112-1116, 2011.

OLIVEIRA, M. M. et al. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 18, supl.2, p. 146-157, 2015.

OTT, P. A. et al. Pembrolizumab in Patients With Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, Aug 16 | JCO2017725069, 2017a.

OTT, P. A. et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with recurrent carcinoma of the anal canal. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 1036-1041, 2017c.

OTT, P. A. et al. Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Advanced Programmed Death Ligand 1-Positive Endometrial Cancer: Results From the KEYNOTE-028 Study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 35, n. 22, p. 2535-2541, 2017b.

PAEZ, J. G. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, New York, v. 304, n. 5676, p. 1497-1500, 2004.

PARISH C. R. Review Article Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. **Immunology and Cell Biology**. V. 81, 106–113, 2003

PENNOCK, G. K.; CHOW, L. Q. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. **Oncologist**, Dayton, v. 20, n. 7, p. 812–822, 2015.

PER UNA VITA COME PRIMA. **p16, ki67 e HPV nel carcinoma della cervice uterina [19/06/2010]**. Available from: <<https://www.perunavitacomeprima.org/ContentValue564L5.aspx>>. Access in: 16 jun. 2017.

PÉREZ-REGADERA, J. et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on disease-free survival and rate of pelvic relapse in patients with advanced cancer of the cervix treated with chemoradiotherapy. **American Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 34, n. 4, p. 395–400, 2011.

PETERS, W. A. et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 18, n. 8, p. 1606-1613, 2000.

PILCH, H. et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinicopathologic parameters and prognostic significance: 10 years' experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. **International Journal of Gynecological Cancer**, Cambridge, v. 11, p. 39-48, 2001.

POWLES, T. et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. **Nature**, London, v. 515, p. 558–562, 2014.

PROBST, H. C. et al. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T-cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. **Nature Immunology**, New York, v. 6, p. 280–286, 2005.

PUNT, S. et al. FoxP3 and IL-17 cells are correlated with improved prognosis in cervical adenocarcinoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, Berlin, v. 64, p. 745–753, 2015.

QUIAGEN. **QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook**: for purification of genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Center Mainz, 2012.

QURESHI, R. et al. Mutation analysis of EGFR and its correlation with the HPV in Indian cervical cancer patients. **Tumour Biology**, Tokyo, v. 37, n. 7, p. 9089-9098, 2016.

REDDY, O. L.; SHINTAKU, P. I.; MOATAMED, N. A. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) is expressed in a significant number of the uterine cervical carcinomas. **Diagnostic pathology**, [London], v. 12, n. 1, p. 45, 2017.

REHMAN, J. A. et al. Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. **Pathology**, Baltimore, v. 30, n. 3, p. 349-349, 2017.

ROMANO E. et al. Nivolumab in Association with Radiotherapy and Cisplatin in Locally Advanced Cervical Cancers Followed by Adjuvant Nivolumab for up to 6 Months (NiCOL). Available form: [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) 2014 <
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03298893?id=NCT02257528+OR+NCT02921269+OR+NCT03298893+OR+NCT02914470&rank=1&load=cart>> Access in: 04 dez. 2017

RODRIGUES, A. N. **Delineamento do perfil molecular relacionado à via do receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR) em estudo de fase I da combinação de erlotinibe e quimiorradiação em portadoras de carcinoma epidermoide do colo uterino estadiamentos IIB A IIIB**. 2009. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais: Minas Gerais, 2009.

ROSE, P. G. et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 15, p. 1144-1153, 1999.

ROSS, J. S. et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. **Molecular & cellular Proteomics**: MCP, Bethesda, v. 3, n. 4, p. 379–398, 2004.

RUSCH v. et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. **Clin Cancer Res**. v. 3(4):515-22, 1997

SAMUELS, S, et al. High levels of soluble MICA are significantly related to increased disease-free and disease-specific survival in patients with cervical adenocarcinoma. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 85, n. 6, p. 476–483, 2015.

SANTIN, A. D. et al. Phase II trial of cetuximab in the treatment of persistent or recurrent squamous or non-squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 122, p. 495–500, 2011.

SANTINI A. ET AL. Nivolumab in Treating Patients with Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer. Available form: [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) 2014 <

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02257528?id=NCT02257528+OR+NCT02921269+OR+NCT03298893+OR+NCT02914470&rank=4&load=cart> Access in: 04 dez. 2017

SCAMBIA, G. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is not related to the prognosis of cervical cancer. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 123, n. 2, p. 135–139, 1998.

SCHIFFMAN M. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 103, n. 5, p. 368-83, 2011.

SCHILDERS, R. J. et al. A phase II trial of erlotinib in recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. **International Journal of Gynecological Cancer**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 929-933, 2009.

SCHWARTZ, S. M. et al. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 19, n. 7, p. 1906–1915.

SEDLIS, A. et al. A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecology Oncology**, New York, v. 72, v. 2, p. 177-183, 1999.

SELVAGGI G. et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, v.15, Issue 1, p. 29-32, 2004.

SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. **Science**, New York, v. 348, p. 56–61, 2015.

SHENG, J. et al. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 20090, 2016.

SKOMEDAL, H. et al. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 73, p. 223–228, 1999.

SMITH, J. S. et al. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, n. 3, p. 324–331, 2002a.

SMALL W. Jr. et al. Cervical cancer: a global health crisis. **Cancer**, v. 123(13):2404-2412; 2017

SMITH, J. S. et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in etiology of invasive cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 94, p.1604–1613, 2002b.

SOONTHORNTHUM, T. et al. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v. 22, n. 10, p. 2166–2178, 2011.

SPAANS, V. M. et al. HLA-E expression in cervical adenocarcinomas: association with improved long-term survival. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 10, p.

184, 2012.

SPANGLE, J. M.; MUNGER, K. The HPV16 E6 oncoprotein causes prolonged receptor protein tyrosine kinase signaling and enhances internalization of phosphorylated receptor species. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3. p. e1003237, 2013.

SPEISER, D. et al. Fertility outcome after radical vaginal trachelectomy: a prospective study of 212 patients. **International Journal of Gynecological Cancer**, Cambridge, v. 21, n. 9, p. 1635-1639, 2011.

SPRING BIOSCIENCE. **M442 PD-L1 Protocol Human**. 2014. Available from: <<https://products.springbio.com/SearchResults.aspx?usterm=PD-L1>> Access in: 03 dez. 2017

SZNOL, M.; CHEN, L. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer CCR focus. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 19, n. 5, p. 1021-1034, 2013.

TAUBE, J. M. et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 20, p. 5064–5074, 2014.

TENG, M. W. et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. **Cancer Research**, Baltimore, v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 2015.

TEWARI, K. S.; MONK, B. J. New strategies in advanced cervical cancer: from angiogenesis blockade to immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 20, p. 5349–5358, 2014.

TEWARI K. et al. Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). **The Lancet**, v. 390, No 10103, p1654-1663, 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **NanoDrop 1000 Spectrophotometer v3.8 user manual**. Wilmington, 2010. Available from: <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>>. Access in: 12 fev. 2017.

THOMPSON, R. H. et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. **Cancer Research**, Baltimore, v. 66, p. 3381-3385, 2006.

THOMPSON, R. H. et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, 17174–17179, 2004.

THULER, I. C. S.; AGUIAR S. S.; BERGMANN A. Determinantes do diagnóstico em estadiamento avançado do câncer do colo do útero no Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** vol.36 no.6 Rio de Janeiro June 2014

TSAI, T. C.; CHEN, S. L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Archives of Virology**, Wien, v. 148, n. 8, p. 1445-1453, 2003.

VANCE, G. H. et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 133, n. 4, p. 611-612, 2009.

WALTER, F. M. et al. Achieving earlier diagnosis of symptomatic cervical cancer. **Br J Gen Pract**. Oct;64(627):495-6, 2014

WANG, X. et al. microRNAs are biomarkers of oncogenic are human papillomavirus infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 111, n. 11, p. 4262-4267, 2014.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practiceguideline update. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, 2013.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practiceguideline update. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 138, n. 2, p. 241-256, 2014.

WOODWORTH, C. D. et al. Inhibition of the epidermal growth factor receptor by erlotinib prevents immortalization of human cervical cells by Human Papillomavirus type 16. **Virology**, New York, v. 421, n. 1, p. 19-27, 2011.

WRIGHT, A. A. et al. KRAS and EGFR mutations to distinguish adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 30, n. 15, suppl., abstr. 5011, 2012. Available from: <http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2012.30.15_suppl.5011>. Access in: 15 jan. 2017.

WRIGHT, A. A. et al. Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. **Cancer**, New York, v. 119, n. 21, p. 3776–3783, 2013.

WU, P. et al. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0131403, 2015.

XIANG, L. et al. Comprehensive analysis of targetable oncogenic mutations in chinese cervical cancers. **Oncotarget**, Albany, v. 6, n. 7, p. 4968–4975, 2015.

YAMASHITA, H. et al. Correlation among six biologic factors (p53, p21(WAF1), MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and clinical outcomes after curative chemoradiation therapy in squamous cell cervical cancer. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, Elmsford, v. 74, n. 4, p. 1165–1172, 2009.

YANG-CHUN, F. et al. Association between PD-L1 and HPV status and the prognostic value for HPV treatment in premalignant cervical lesion patients. **Medicine**, Hagerstown, v. 96, n. 25, p. e7270, 2017.

YEWALE, C. et al. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. **Biomaterials**, [Guilford, England], v. 34, n. 34, p. 8690–8707, 2013.

YIM, E. K.; PARK, J. S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated

Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research and Treatment**: Official Journal of Korean Cancer Association, Seoul, v. 37, n. 6, p. 319-324, 2005.

ZARDAVAS, D. et al. Clinical management of breast cancer heterogeneity. **Nature Reviews Clinical Oncology**, London, v. 12, n. 7, p. 381-394, 2015.

ZHANG, B.; SPANDA, D. F.; ROMAN, A. E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 76, n. 1, p. 220-231, 2002.

ZHANG, W. et al. EGFR Promoter Methylation, EGFR Mutation, and HPV Infection in Chinese Cervical Squamous Cell Carcinoma. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, Hagerstown, v. 23, n. 9, p. 661-666, 2015.


APÊNDICE A – Telas do sistema do registro de dados eletrônicos descriminado todas as variáveis coletadas.


◀ Dados D...(0/19) Comorbi...(0/7) ▶ -- Select to Jump -- ▾

Title: Dados Demográficos

Instructions:

Informações Iniciais

Data do Diagnóstico Clínico  *

Data de Nascimento  * Idade (Anos)


Histórico


Idade Menarca * (Anos) Idade Sexarca * (Anos)

Total de Parceiros *

Gestações prévias (Selecione) ▾ * Quantas *

Menopausa (Selecione) ▾ *

Data do último preventivo  *

DUM  *

Tabagismo (Selecione) ▾ *

Contraceptivos

Contraceptivos (Selecione) ▾ *

Uso Contraceptivos Atual *
 Prévio

Hormonal Oral *
 DIU
 Outros
 Não se aplica

Outro *

Não hormonal Preservativo *
 DIU de cobre
 Não se aplica

Barreira Sempre *
 As vezes
 Nunca
 Indisponível

Observação

← Dados C...(0/6)
Tratame...(0/14)
Progres...(0/4)
▶ -- Select to Jump -- ▾

Title: Tratamento

Cirurgia

Cirurgia (Selecione) * Data *

Radioterapia

Radioterapia (Selecione) * Status (Selecione) *

Início * Término *

Braquiterapia

Braquiterapia (Selecione) * Status (Selecione) *

Início * Término *

Quimioterapia

Quimioterapia (Selecione) * Status (Selecione) *

Início * Término *

← Dados C...(0/6)
Tratame...(0/14)
Progres...(0/4)
▶ -- Select to Jump -- ▾

Title: Progressão

Progressão (Selecione) *

Informações sobre a Progressão

Data	Tipo	Região	
<input type="text"/> *	(Selecione) *	(Selecione) *	X

Add

← **Dados C...(0/6)** **Tratame...(0/14)** **Progres...(0/4)** ▶ -- Select to Jump -- ▼

Title: Dados Clínicos

PS	(Selecione) ▼ *
Estadiamento	(Selecione) ▼ *
Tamanho do Tumor	<input type="text"/> * (mm)
Histopatologia	(Selecione) ▼ *
Linfonodos	(Selecione) ▼ *
Invasão linfovascular	(Selecione) ▼ *

← **Dados D...(0/19)** **Comorbi...(0/7)** ▶ -- Select to Jump -- ▼

Title: Comorbidades

Comorbidades

Comorbidades?	(Selecione) ▼ *
Hipertensão	(Selecione) ▼ *
Diabetes	(Selecione) ▼ *
HIV	(Selecione) ▼ *
Hepatite	(Selecione) ▼ *
Outras DSTs?	(Selecione) ▼ *
Qual?	<input type="text"/> *

APÊNDICE B – Sequenciamento do EGFR. Demonstração dos primers normais e os internos utilizados (grifados)

(todos no sentido 5'-3')

E18 F GGGCTGAGGTGACCCTTGTC
E18 R TCCCACCAAGACCATGAGAG
(CTCTCATGGTCTGGTGGGGA)

E18 Fint CTTGTCCCCCCCAGCTTGT
E18 Rint TGTGCCAGGGACCTTACCTTA
(TAAGGTAAGGTCCCTGGCACA)

Éxon 18 (226 pb)

GGGCTGAGGTGACCCTTGTCTCTGTGTTCTTGTCCCCCCAG**CTTGTGGAGCCTCTTACACCCA**
GTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAA
GTGCTGGGCTCCGGTTCGTTTCGGCACGGTGTATAAGGTAAGGTCCCTGGCACAGGCCTCTGGGC
TGGGCCGCAGGGCCTCTCATGGTCTGGTGGGGA

Parte 1 F + R (182 pb)

GGGCTGAGGTGACCCTTGTCTCTGTGTTCTTGTCCCCCCAG**CTTGTGGAGCCTCTTACACCCA**
GTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAA
GTGCTGGGCTCCGGTTCGTTTCGGCACGGTGTATAAGGTAAGGTCCCTGGCACA

Parte 2 F + R (198 pb)

GGGCTGAGGTGACCCTTGTCTCTGTGTTCTTGTCCCCCCAG**CTTGTGGAGCCTCTTACACCCA**
GTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAA
GTGCTGGGCTCCGGTTCGTTTCGGCACGGTGTATAAGGTAAGGTCCCTGGCACAGGCCTCTGGGC
TGGGCCGCAGGGCCTCTCATGGTCTGGTGGGGA

E19 F ACCATCTCACAATTGCCAGTTAA
E19 R GAGGTTTCAGAGCCATGGAC
(GTCCATGGCTCTGAACCTC)

E19 Fint CTCTCTGTGCATAGGGACTC
E19 Rint CAAAGCAGAACTCACATCG
(CGATGTGAGTTTCTGCTTTG)

Éxon 19 (192 pb)

ACCATCTCACAATTGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCCAGAA
GGTGAGAAAGTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAC
AAGGAAATCCTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGG**GTCCATGGCTCTGAACCTC**

Parte 1 F + R (122 pb)

ACCATCTCACAATTGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCCAGAA
GGTGAGAAAGTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAC
AAGGAAATCCTCGATGTGAGTTTCTGCTTTG

Parte 2 F + R (159 pb)

ACCATCTCACAATTGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCCAGAA
GGTGAGAAAGTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAC
AAGGAAATCCTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGG**GTCCATGGCTCTGAACCTC**

E20 F TTCTGGCCACCATGCGAAG
E20 R GGCTCCTTATCTCCCCTCCC
(GGGAGGGGAGATAAGGAGCC)

E20 Fint GGAAGCCTACGTGATGGCC
E20 Rint GTGTTCCCGACATAGTCCA
(TGGACTATGTCCGGGAACAC)

Exon 20 (277 pb)

**TTCTGGCCACCATGCGAAGCCACACTGACGTGCCTCTCCCTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGATG
GCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAG
CTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATT
GGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAGGTAATCAGGGAAGGGAGATACG
GGGAGGGGAGATAAGGAGCC**

Parte 1 F + R (181 pb)

**TTCTGGCCACCATGCGAAGCCACACTGACGTGCCTCTCCCTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGATG
GCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAG
CTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACAC**

Parte 2 F+ R (229 pb)

**TTCTGGCCACCATGCGAAGCCACACTGACGTGCCTCTCCCTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGATG
GCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAG
CTCATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATT
GGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAGGTAATCAGGGAAGGGAGATACG
GGGAGGGGAGATAAGGAGCC**

E21 F TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTT
E21 R ATGCTGGCTGACCTAAAGCC
(GGCTTTAGGTCAGCCAGCAT)

E21 Fint CGCAGCATGTCAAGATCAC
E21 Rint ACTTTGCCTCCTTCTGCAT
(ATGCAGAAGGAGGCAAAGT)

Éxon 21 (212 pb)

**TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTTTCAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCG
CGACCTGGCAGCCAGGAACGTACTGGTGAACACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGG
CTGGCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTAAGGAGGT
GGCTTTAGGTCAGCCAGCAT**

Parte 1 F + R (184 pb)

**TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTTTCAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCG
CGACCTGGCAGCCAGGAACGTACTGGTGAACACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGG
CTGGCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGT**

Parte 2 F + R (113 pb)

**TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTTTCAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCG
CGACCTGGCAGCCAGGAACGTACTGGTGAACACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGG
CTGGCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTAAGGAGGT
GGCTTTAGGTCAGCCAGCAT**

APÊNDICE C – STROBE Statement - Checklist of items that should be included in reports of cohort studies:

Item	Nº	Recomendação	Localização	Página
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado	Resumo – termo usado: coorte	i-vi
Introdução				1-2
Contexto/Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.	Introdução e Revisão da Literatura	3-26
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes	Objetivos	27
Métodos				
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.	Materiais e Métodos na subseção população alvo	29
Contexto (<i>setting</i>)	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados.	Materiais e Métodos na subseção população alvo, delineamento do estudo e revisão histopatológica.	28-30
Participantes	6	Estudos de Coorte: Apresente os critérios de elegibilidade, fontes e métodos de seleção dos participantes. Descreva os métodos de acompanhamento.	Materiais e Métodos na subseção critérios de inclusão e exclusão de pacientes, perdas de pacientes e delineamento do estudo	31-33
Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.	Materiais e Métodos na subseção variáveis coletadas	32-33
Fontes de dados/ Mensuração	8	Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.	Materiais e Métodos na subseção variáveis coletadas, montagem de TMA, avaliação de PD-L1, extração de DNA, quantificação e análise da qualidade dos ácidos nucleicos, amplificação do DNA e Sequenciamento do EGFR, imunohistoquímica para PD-L1	32-38
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de vies.	Materiais e Métodos na subseção variáveis coletadas.	32-38
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.	Materiais e métodos	29

Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e porque.	Materiais e métodos na subseção variáveis coletadas	32-39
Métodos estatísticos	12	Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes ("missing data") Estudos de Coorte: Se aplicável, explique como as perdas de acompanhamento foram tratadas. Descreva qualquer análise de sensibilidade.	Materiais e métodos na subseção análise estatística	39
Resultados				
Participantes	13	Descreva o número de participantes em cada etapa do estudo (ex: número de participantes potencialmente elegíveis, examinados de acordo com critérios de elegibilidade, elegíveis de fato, incluídos no estudo, que terminaram o acompanhamento e efetivamente analisados) Descreva as razões para as perdas em cada etapa. Avalie a pertinência de apresentar um diagrama de fluxo	Seção de materiais e métodos na subseção perdas de pacientes.	31
Dados descritivos	14	Descreva as características dos participantes (ex: demográficas, clínicas e sociais) e as informações sobre exposições e confundidores em potencial. Indique o número de participantes com dados faltantes para cada variável de interesse. Estudos de Coorte: Apresente o período de acompanhamento (ex: média e tempo total)	Seção de Resultados	41-56
Desfecho	15	Estudos de Coorte: Descreva o número de eventos-desfecho ou as medidas-resumo ao longo do tempo.	Seção de Resultados	55-56
Resultados principais	16	Descreva as estimativas não ajustadas e, se aplicável, as estimativas ajustadas por variáveis confundidoras, assim como sua precisão (ex: intervalos de confiança). Deixe claro quais foram os confundidores utilizados no ajuste e porque foram incluídos. Quando variáveis contínuas forem categorizadas, informe os pontos de corte utilizados.	Seção de Resultados	41-56

		Se pertinente, considere transformar as estimativas de risco relativo em termos de risco absoluto, para um período de tempo relevante.		
Outras analyses	17	Descreva outras análises que tenham sido realizadas. Ex.: análises de subgrupos, interação, sensibilidade.	Seção de Resultados	41-56
Discussão				
Resultados principais	18	Resuma os principais achados relacionando-os aos objetivos do estudo.	Seção de Discussão	61
Limitações	19	Apresente as limitações do estudo, levando em consideração, fontes potenciais de viés ou imprecisão. Discuta a magnitude e direção de vieses em potencial.	Seção de Discussão subseção limitações	70
Interpretação	20	Apresente uma interpretação cautelosa dos resultados, considerando os objetivos, as limitações, a multiplicidade das análises, os resultados de estudos semelhantes e outras evidências relevantes.	Seção de Discussão	61-70
Generalização	21	Discuta a generalização (validade externa) dos resultados	Seção de Discussão	75
Outras informações				
Financiamento	22	Especifique a fonte de financiamento do estudo e o papel dos financiadores. Se aplicável, apresente tais informações para o estudo original no qual o artigo é baseado.	Recursos capitados por projetos de pesquisa dos colaboradores	29

TMA: *tissue microarray* PD-L1: *programmed death-ligand 1*.

Fonte: Malta et al., 2010.

APENDICE D: Tabela D.1: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo escamoso, de acordo com variáveis epidemiológicas e clínicas.

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	SG 2 anos	SG 5 anos	SG mediana	p-valor
Idade (anos)							
≤ 60	95	46	48,4	56,8	51,3	*	0,587
>60	33	18	54,5	63,6	41,4	42,45 (16,85-60,05)	
Idade da menarca (anos)							
≤ 14	97	44	45,4	64,9	53,4	*	0,036
>15	29	19	65,5	34,5	34,5	21,29 (15,22-27,35)	
Idade da sexarca (anos)							
≤15	39	20	51,3	53,5	47,9	45,44 (+)	0,153
15-20	64	27	42,2	64,1	56,8	*	
>20	21	14	66,7	47,6	33,3	23,13 (0,00-51,62)	
Número de parceiros							
0-5 anos	106	53	50,0	58,4	49,0	59,99 (+)	0,838
≥ 6 anos	14	7	50,0	50,0	50,0	22,70 (+)	
Números de gestações prévia							
Sim	125	62	49,6	58,2	49,2	*	0,876
Não	2	1	50,0	50,0	50,0	*	
Menopausa							
Sim	63	31	49,2	61,7	48,0	59,99 (+)	0,882
Não	64	32	50,0	54,7	49,9	45,44 (+)	
Tempo entre o último CCO e o diagnóstico do CC (anos)							
<1	13	2	15,4	92,3	83,9	*	0,114
1-3	44	19	43,2	65,7	55,3	*	
>3	16	8	50,0	48,6	48,6	22,21 (+)	
Tabagismo							
Sim	59	27	45,8	57,4	52,7		0,616
Não	69	37	53,6	57,8	45,6	45,31 (+)	
Comorbidades							
Sim	49	29	53,1	57,1	45,5	46,85	0,560
Não	79	38	48,1	58,1	51,0	*	
Uso de contraceptivos							
Sim	76	35	46,1	59,2	53,14	*	0,383
Não	49	27	55,1	54,4	42,1	42,45 (14,74-70,16)	
FIGO							
IA e IB1	16	1	6,2	93,8	93,8	*	0,001
IB2-IVB	112	63	56,2	52,4	42,4	39,03 (18,43-59,63)	

Tamanho do tumor (cm)†							
≤4 cm	42	14	33,3	71,4	65,6	*	0,028
>4 cm	81	45	55,6	52,7	43,3	39,03 (14,23-63,83)	
Linfonodo positivo em pacientes que fizeram cirurgia							
Sim	5	1	20,0	80,0	80,0	+	0,519
Não	19	2	10,5	89,5	89,5	+	
Invasão Linfovascular em pacientes que fizeram cirurgia							
Sim	6	1	16,7	83,3	83,3	+	0,676
Não	18	2	11,1	87,5	80,2	+	
Cirurgia							
Sim	25	4	16,0	84,0	84,0	*	0,001
Não	103	60	68,3	51,2	40,4	38,41 (18,64-58,18)	
Quimioterapia							
Sim	81	35	43,2	66,7	56,0	*	0,006
Não	44	26	59,1	45,2	39,2	17,41 (0,00-45,67)	
Radioterapia							
Sim	100	50	50,0	58,7	48,9	59,99 (+)	0,603
Não	26	12	46,2	57,7	52,9	*	
Braquiterapia							
Sim	75	27	46,0	71,7	62,7	*	<0,001
Não	50	34	68,0	40,0	30,6	15,74 (5,15-26,32)	
Recorrência ou progressão							
Sim	63	57	90,5	20,6	9,5	14,62 (10,38-18,85)	<0,001
Não	65	7	10,8	93,8	88,2	*	

SG: sobrevida global; CCO: citologia cervical oncológica; CC: câncer do colo do útero; FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia; *mediana não alcançada; +valor não pôde ser calculado; †visível ao exame físico; em negrito os valores de $p < 0,05$.

Tabela D.2: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo escamoso, de acordo com variáveis morfológicas

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	SG 2 anos	SG 5 anos	SG mediana (IC)	p-valor
Mitose, por 10 campos							
<20	75	34	45,3	63,8	53,6	*	0,055
≥20	48	28	58,3	45,7	40,8	18,10 (0,00-41,41)	
Tipo de estroma							
Fibroso	56	32	57,1	49,8	42,1	22,40 (0,00-49,26)	0,138
Fibromuscular	69	31	44,9	63,6	53,4	*	
Quantidade de infiltrado inflamatório							
Leve	62	31	50,0	57,9	48,8	59,99 (+)	0,605
Moderada	48	26	54,2	53,4	44,1	41,23 (11,55-70,91)	
Acentuada	15	6	40,0	66,7	59,3	*	
Tipo de infiltrado inflamatório							
Linfoplasmocitário	101	48	47,5	61,2	51,2	*	0,020
Polimorfonucleares	6	5	83,6	16,7	16,7	8,11 (2,83-13,40)	
Misto	18	10	55,6	50,0	42,9	21,29 (0,00-65,57)	
Local do infiltrado inflamatório							0,095
Intratumoral e ou Peritumoral	107	57	53,3	53,3	45,9	42,25 (+)	
Exclusivamente estromal	12	3	25,0	91,7	71,3	*	
Pleomorfismo							
Leve	2	1	50,0	50,0	50,0	8,21 (+)	0,041
Moderado	77	32	41,6	67,3	57,3	*	
Acentuado	46	30	65,2	41,3	33,3	18,56 (12,70-24,42)	
Pleomorfismo							
Leve e moderado	79	33	41,8	66,9	53,5	*	0,012
Acentuado	46	30	65,2	41,3	33,1	18,56 (12,70-24,42)	
Grau de diferenciação							
Pouco diferenciado	12	5	41,7	75,0	58,3	*	0,123
Moderadamente diferenciado	80	37	46,2	62,2	52,3	*	
Bem diferenciado	28	18	64,3	42,9	34,3	17,87 (10,42-25,33)	
Grau de diferenciação							
Pouco e moderado	92	42	45,7	62,8	53,0	*	0,044
Acentuado	28	18	64,3	42,9	34,3	17,87 (10,42-25,33)	
Expressão de PD-L1							0,631
Sim	65	34	52,3	56,7	47,0	45,31 (+)	
Não	43	20	46,5	60,5	52,0	*	
Expressão de PD-L1							0,233
Sem expressão	43	20	46,5	60,5	52,0	*	
1-50%	50	29	58,0	51,6	40,8	37, 16 (11,03-63,29)	
51-100%	15	5	33,3	66,7	66,7	*	

Classificação PD-L1 de acordo com Reddy et al (2017)							0,510
Negativo	43	20	46,5	60,5	52,0	*	
1A	35	19	54,3	50,9	44,5	41,23 (96,20-76,26)	
1B	15	10	66,7	53,3	33,3	37,16 (11,61-62,71)	
2A	4	1	25,0	100,0	75,0	*	
2B	11	4	36,4	63,6	63,6	*	
PD-L1 expressão e intensidade							0,233
Negativo	43	20	46,5	60,5	52,0	*	
1A e 1B	50	29	58,0	51,6	40,8	37,16 (11,03-63,29)	
2A e 2B	15	5	33,3	73,3	66,7	*	
Heterogeneidade da expressão de PD-L1							0,531
Sim	12	5	41,7	66,7	58,3	*	
Não	96	49	51,0	57,2	49,2	45,44 (+)	
Intensidade da expressão de PD-L1							0,661
Sem expressão	43	20	46,5	60,5	52,0	*	
Fraco	39	20	51,3	56,0	47,6	45,44 (+)	
Moderado	22	13	59,1	54,5	40,9	37,16 (10,62-63,70)	
Acentuado	4	1	25,0	75,0	75,0	*	

SG: sobrevida global; *mediana não alcançada; +valor não pôde ser calculado; †visível ao exame físico; em negrito os valores de $p < 0,05$.

Tabela D.3: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida, de acordo com das variáveis epidemiológicas e clínicas do câncer do colo do útero do tipo escamoso

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	HR	IC 95%	p-valor
Idade						
≤ 60 anos	95	46	48,4	1		
>60 anos	33	18	54,5	1,67	0,67-2,01	0,587
Idade da menarca (anos)						
≤ 14	97	44	45,4	1		
>14	29	19	65,5	1,77	1,03-3,03	0,038
Idade da sexarca (anos)						
≤15	39	20	51,3	1		
15-20	64	27	42,2	0,74	0,42-1,32	0,312
>20	21	14	66,7	1,38	0,70-2,74	0,350
Número de parceiros						
0-5 anos	106	53	50,0	1		
≥ 6 anos	14	7	50,0	0,92	0,42-2,03	0,838
Gestação prévia						
Sim	125	62	49,6	0,85	0,12-6,17	0,876
Não	2	2	50,0	1		
Menopausa						
Sim	63	31	49,2	0,96	0,59-1,58	0,882
Não	64	32	50,0	1		
Tempo entre o último CCO e o diagnóstico de câncer (anos)						
<1	13	2	15,4	1		
1-3	44	19	43,2	3,33	0,77-	0,106
>3	16	8	50,0	4,68	0,99-	0,051
Tabagismo						
Sim	59	27	45,8	0,88	0,54-1,45	0,617
Não	69	37	53,6	1		
Comorbidades						
Sim	49	29	53,1	1,16	0,70-1,91	0,560
Não	79	38	48,1	1		
Uso de contraceptivos						
Sim	76	35	46,1	0,80	0,48-1,32	0,384
Não	49	27	55,1	1		
FIGO						
Ia e Ib1	16	1	6,2	1		
Ib2-IVb	112	63	56,2	12,69	1,76-	0,012
Tamanho do tumor (cm)†						
≤4	42	14	33,3	1		
>4	81	45	55,6	1,94	1,06-3,54	0,031

Linfonodo positivo em pacientes que fizeram cirurgia						
Sim	5	1	20,0	2,16	0,19-	0,208
Não	19	2	10,5	1		
Invasão Linfovascular em pacientes que fizeram cirurgia						
Sim	3	1	16,7	1,66	0,15-	0,250
Não	21	2	11,1	1		
Cirurgia						
Sim	25	4	16,0	0,21	0,07-0,57	0,002
Não	103	60	68,3	1		
Quimioterapia						
Sim	81	35	43,2	0,50	0,30-0,83	0,007
Não	44	26	59,1	1		
Radioterapia						
Sim	100	50	50,0	0,85	0,45-1,59	0,603
Não	26	12	46,2	1		
Braquiterapia						
Sim	75	27	46,0	0,32	0,19-0,54	<0,001
Não	50	34	68,0	1		
Recorrência ou progressão						
Sim	63	57	90,5	20,05	8,98-	<0,001
Não	65	7	10,8	1		

SG: sobrevida global; HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confiança; FIGO: Federação internacional de Ginecologia e Obstetrícia; † visível no exame físico; em negrito os valores de $p < 0,05$.

Tabela D.4: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida, de acordo com as variáveis morfológicas em câncer do colo do útero do tipo escamoso.

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	HR	IC 95%	p-valor
Mitose, por 10 campos						
<20	75	34	45,3	1		
≥20	48	28	58,3	1,63	0,99-2,69	0,057
Tipo de estroma						
Fibroso	56	32	57,1	1		
Fibromuscular	69	31	44,9	0,69	0,42-1,13	0,141
Quantidade de infiltrado inflamatório						
Leve	62	31	50,0	1		
Moderado	48	26	54,2	1,14	0,68-1,92	0,627
Acentuado	15	6	40,0	0,73	0,30-1,75	0,481
Tipo de infiltrado inflamatório						
Linfoplasmocitário	101	48	47,5	1		
Polimorfonuclear	6	5	83,6	3,45	0,68-8,78	0,009
Misto	18	10	55,6	1,34	0,68-2,65	0,400
Local do infiltrado inflamatório						
Estromal	12	3	25,0	1		
Intratumoral + Peritumoral	107	57	53,3	2,59	0,81-8,28	0,108
Pleomorfismo						
Leve	2	1	50,0	1		
Moderado	77	32	41,6	0,68	0,09-5,04	0,712
Acentuado	46	30	65,2	1,30	0,18-9,52	0,798
Pleomorfismo						
Leve e moderado	79	33	41,8	1		
Acentuado	46	30	65,2	1,87	1,14-3,07	0,014
Grau de diferenciação						
Pouco	12	5	41,7	1		
Moderado	80	37	46,2	1,19	0,47-3,02	0,718
Bem	28	18	64,3	2,04	0,76-5,50	0,159
Expressão de PD-L1						
Sim	65	34	52,3	1,14	0,66-1,99	0,632
Não	43	20	46,5	1		
Expressão de PD-L1						
Sem expressão	43	20	46,5	1		
1-50%	50	29	58,0	1,33	0,75-2,36	0,321
51-100%	15	5	33,3	0,63	0,23-1,67	0,351
Classificação PD-L1 de acordo com Reddy et al (2017)						
Negativo	43	20	46,5	1		
1A	35	19	54,3	1,26	0,67-2,37	0,463

1B	15	10	66,7	1,49	0,70-3,18	0,304
2A	4	1	25,0	0,41	0,05-3,02	0,379
2B	11	4	36,4	0,73	0,25-2,12	0,559
PD-L1 expressão e intensidade						
Negativo	43	20	46,5	1		
1A e 1B	50	29	58,0	1,33	0,75-2,36	0,321
2A e 2B	15	5	33,3	0,63	0,23-1,67	0,351
Heterogeneidade da expressão de PD-L1						
Sim	12	5	41,7	0,75	0,30-1,87	0,533
Não	96	49	51,0	1		
Intensidade da expressão de PD-L1						
Sem expressão	43	20	46,5	1		
Fraca	39	20	51,3	1,14	0,61-2,13	0,671
Moderada	22	13	59,1	1,31	0,65-2,64	0,443
Acentuada	4	1	25,0	0,42	0,06-3,20	0,409

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confiança; em negrito os valores de $p < 0,05$.

Tabela D.5: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma, de acordo com variáveis epidemiológicas e clínicas

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	SG 2 anos	SG 5 anos	SG mediana	P valor
Idade (anos)							
≤ 60	40	14	35,0	77,5	64,3	*	0,009
>60	16	11	68,8	50,0	29,2	22,14 (9,46-34,83)	
Idade da menarca (anos)							
≤ 14	41	17	41,5	73,2	57,6	*	0,351
>14	14	8	57,1	57,1	40,0	25,69 (0,00-73,68)	
Idade da sexarca (anos)							
≤15	4	1	25,0	75,0	75,0	*	0,728
15-20	39	18	46,2	71,8	52,9	*	
>20	9	3	33,3	66,7	66,7	*	
Número de parceiros							
0-5 anos	44	20	45,5	68,2	53,8	*	0,613
≥ 6 anos	9	3	33,3	77,8	64,8	*	
Gestação prévia							
Sim	52	23	44,2	69,2	55,1	*	0,922
Não	4	2	50,0	75,0	50,0	54,01 (+)	
Menopausa							
Sim	34	20	58,8	58,8	40,4	28,12 (0,68-55,57)	0,009
Não	22	5	22,7	86,4	76,5	*	
Tempo entre o último CCO e o diagnóstico de câncer (anos)							
>1	3	1	33,3	100,0	66,7	*	0,872
1-3	30	11	36,7	76,7	63,0	*	
>3	10	4	40,0	70,0	58,3	*	
Tabagismo							
Sim	19	10	52,6	63,2	44,3	54,01 (2,69-105,34)	0,356
Não	37	15	40,5	73,0	59,0	*	
Comorbidades							
Sim	26	15	57,7	65,4	41,2	45,44 (12,09-78,79)	0,105
Não	30	10	33,3	73,3	66,3	*	
Uso de contraceptivos							
Sim	38	13	34,2	71,1	65,1	*	0,060
Não	17	11	64,5	70,6	35,3	37,45 (10,90-64,00)	
FIGO							
IA e IB1	13	1	7,2	100,0	90,9	*	0,006
IB2-IVB	43	24	55,8	60,5	44,0	45,48 (9,76-81,11)	
Tamanho do tumor (cm)†							
≤4	30	10	33,3	76,7	65,9	*	0,162
>4	24	13	54,2	66,7	45,1	46,98 (+)	

Linfonodo positivo em pacientes que fizeram cirurgia							
Sim	2	1	50,0	50,0	50,0	19,22 (+)	0,273
Não	16	3	18,8	87,5	80,2	*	
Invasão Linfovascular em pacientes que fizeram cirurgia							
Sim	2	1	50,0	50,0	50,0	19,22 (+)	0,273
Não	16	3	18,8	87,5	80,2	*	
Cirurgia							
Sim	18	4	32,2	83,3	76,9	*	0,031
Não	38	21	55,3	63,2	44,7	45,44 (6,34-84,54)	
Quimioterapia							
Sim	29	13	44,8	75,9	55,2	*	0,034
Não	26	11	52,3	65,4	56,7	*	
Radioterapia							
Sim	39	19	48,7	69,2	50,8	*	0,326
Não	16	5	31,2	75,0	68,2	*	
Braquiterapia							
Sim	34	15	44,1	73,5	55,3	*	0,739
Não	21	9	42,9	66,7	56,4	*	
Recorrência ou progressão							
Sim	31	23	74,2	48,4	25,8	*	<0,001
Não	25	2	8,0	96,0	91,8	22,60 (12,89-32,31)	

SG: sobrevida global; *mediana não alcançada; +valor não pôde ser calculado; †visível no exame físico; em negrito os valores de $p < 0,05$.

Tabela D.6: Letalidade e sobrevida em dois e cinco anos dos casos de câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma, de acordo com variáveis morfológicas

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	SG 2 anos	SG 5 anos	SG mediana (IC)	p-valor
Mitose, por 10 campos							
<20	41	17	41,5	73,2	57,3	*	0,210
≥20	8	5	62,5	50,0	37,5	22,14 (2,75-41,54)	
Tipo de estroma							
Fibroso	13	4	30,8	69,2	69,2	*	0,291
Fibromuscular	42	21	50,0	69,0	49,1	54,01 (+)	
Quantidade de infiltrado inflamatório							
Leve	29	14	48,3	65,6	50,0	54,01 (+)	0,177
Moderado	17	5	29,4	82,4	70,6		
Acentuado	9	6	66,7	55,6	33,3	28,12 (11,99-44,25)	
Tipo inflamatório							
Linfoplasmocitário	31	12	38,7	86,0	60,7	*	0,564
Polimorfonucleares	5	3	60,0	40,0	40,0	18,43 (10,32-26,54)	
Misto	19	10	52,6	84,2	46,8	46,98 (+)	
Local da inflamação							0,295
Intratumoral e ou Peritumoral	40	20	50,0	67,5	48,7	54,11 (+)	
Exclusivamente estromal	15	5	33,0	73,3	66,7	*	
Pleomorfismo							
Leve	9	4	33,3	88,9	66,7	*	0,045
Moderado	35	14	40,0	74,3	58,9	*	
Acentuado	11	8	72,7	36,4	27,3	22,14 (15,30-28,98)	
Pleomorfismo							
Leve e moderado	44	17	38,6	77,3	60,2	*	0,015
Acentuado	11	8	72,7	36,4	27,3	22,14 (15,30-28,98)	
Grau de diferenciação							
Pouco diferenciado	12	6	50,0	58,3	50,0	37,46 (+)	0,822
Moderadamente diferenciado	28	12	42,9	71,4	56,4	*	
Bem diferenciado	14	6	42,9	78,6	54,4	*	
Expressão de PD-L1							0,836
Sim	18	9	50,0	66,7	48,6	54,01 (+)	
Não	30	15	50,0	66,7	50,0	46,98 (+)	
Expressão de PD-L1							0,831
Sem expressão	30	15	50,0	66,7	48,6	54,01(+)	
1-50%	15	7	46,7	66,7	53,3	*	
51-100%	3	2	66,7	66,7	33,3	45,44 (0,00-102,38)	
Classificação PD-L1 de acordo com Reddy et al (2017)							0,907
Negativo	30	15	50,0	66,7	48,6	+	
1ª	14	7	50,0	64,3	50,0	+	
1B	1	0	0,0	0,00	0,00	+	

2A	1	1	100,0	100	0,00	+	
2B	2	1	50,0	50,0	50,0	+	
PD-L1 expressão e intensidade							0,831
Negativo	10	15	50,0	66,7	48,6	54,01(+)	
1A e 1B	15	7	46,7	66,7	53,3	*	
2A e 2B	3	2	66,7	66,7	33,3	45,44 (0,00-102,38)	
Heterogeneidade da expressão de PD-L1							0,234
Sim	2	0	0,0	100,0	100,0	+	
Não	48	24	50,0	66,7	48,8	+	
Intensidade da expressão de PD-L1							0,905
Sem expressão	30	15	50,0	66,7	48,6	54,01 (+)	
Fraco	15	8	53,7	66,7	46,7	46,98 (+)	
Moderado	3	1	64,0	66,7	66,7	*	
Acentuado	0	0	+	+	+	+	

SG: sobrevida global; FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia;
 *mediana não alcançada; +valor não pôde ser calculado

Tabela D.7: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida: avaliação das variáveis epidemiológicas e clínica no câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma.

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	HR	IC 95%	p-valor
Idade (anos)						
≤ 60	40	14	35,0	1		
>60	16	11	68,8	2,75	1,24-6,10	0,013
Idade da menarca (anos)						
≤ 14 anos	41	17	41,5	1		
>14 anos	14	8	57,1	1,49	0,64-3,45	0,354
Idade da sexarca (anos)						
≤15	4	1	25,0	1		
15-20	39	18	46,2	1,85	0,25-13,88	0,549
>20	9	3	33,3	1,30	0,13-12,54	0,819
Número de parceiros						
0-5 anos	44	20	45,5	1		
≥ 6 anos	9	3	33,3	0,73	0,22-2,46	0,614
Gestação prévia						
Sim	52	23	44,2	0,93	0,22-3,95	0,922
Não	4	2	50,0	1		
Menopausa						
Sim	34	20	58,8	3,43	1,28-9,16	0,014
Não	22	5	22,7	0		
Tempo entre o último CCO e o diagnóstico do câncer (anos)						
<1	3	1	33,3	1		
1-3	30	11	36,7	1,32	0,17-10,25	0,789
>3	10	4	40,0	1,67	0,19-15,01	0,646
Tabagismo						
Sim	19	10	52,6	1,46	0,65-3,25	0,358
Não	37	15	40,5	1		
Comorbidades						
Sim	26	15	57,7	1,92	0,86-4,27	0,111
Não	30	10	33,3	1		
Uso de contraceptivos						
Sim	38	13	34,2	0,47	0,21-1,05	0,066
Não	17	11	64,5	1		
FIGO						
IA e IB1	13	1	7,2	1		
IB2-IVB	43	24	55,8	9,81	1,32-72,56	0,025
Tamanho do tumor (cm)†						
≤4	30	10	33,3	1		
>4	24	13	54,2	1,78	0,78-4,08	0,168

Linfonodo positivo em pacientes que fizeram cirurgia						
Sim	2	1	50,0	3,33	0,34-32,54	0,301
Não	16	3	18,8	1		
Invasão Linfovacular em pacientes que fizeram cirurgia						
Sim	2	1	50,0	3,33	0,34-32,54	0,301
Não	16	3	18,8	1		
Cirurgia						
Sim	18	4	32,2	0,33	0,11-0,95	0,040
Não	38	21	55,3	1		
Quimioterapia						
Sim	29	13	44,8	0,95	0,42-2,11	0,894
Não	26	11	52,3	1		
Radioterapia						
Sim	39	19	48,7	1,63	0,61-4,37	0,331
Não	16	5	31,2	1		
Braquiterapia						
Sim	34	15	44,1	0,87	0,38-1,99	0,740
Não	21	9	42,9	1		
Recorrência ou progressão						
Sim	31	23	74,2	14,78	3,47-62,98	<0,001
Não	25	2	8,0	1		

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confiança; FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia; *mediana não alcançada; +valor não pôde ser calculado; †visível no exame físico; em negrito os valores de $p < 0,05$.



Tabela D.8: Análise univariada dos fatores associados à sobrevida de acordo com variáveis morfológicas em câncer do colo do útero do tipo adenocarcinoma.

Variáveis	N total	N de óbito	% de óbito	HR	IC 95%	p-valor
Mitose, por 10 campos						
<20	41	17	41,5	1		
≥20	8	5	62,5	1,87	0,69-5,09	0,218
Tipo de estroma						
Fibroso	13	4	30,8	1		
Fibromuscular	42	21	50,0	1,76	0,61-5,14	0,298
Quantidade de infiltrado inflamatório						
Leve	29	14	48,3	1		
Moderado	17	5	29,4	0,52	0,19-1,46	0,217
Acentuado	9	6	66,7	1,57	0,60-4,09	0,357
Tipo de infiltrado inflamatório						
Linfoplasmocitário	31	12	38,7	1		
Polimorfonuclear	19	10	52,6	1,22	0,55-6,99	0,297
Misto	5	3	60,0	1,97	0,53-2,83	0,640
Local do infiltrado inflamatório						
Exclusivo estromal	15	5	33,0	1		
Intratumoral + Peritumoral	40	20	50,0	1,68	0,63-4,48	0,300
Pleomorfismo						
Leve	9	4	33,3	1		
Moderado	35	14	40,0	1,42	0,41-4,95	0,581
Acentuado	11	8	72,7	3,65	0,96-13,86	0,058
Pleomorfismo						
Leve e moderado	44	17	38,6	1		
Acentuado	11	8	72,7	2,75	1,18-6,43	0,019
Grau de diferenciação diferenciado						
Pouco diferenciado	12	6	50,0	1		
Moderadamente diferenciado	28	12	42,9	0,76	0,28-2,03	0,583
Bem diferenciado	14	6	42,9	0,72	0,23-2,24	0,575
Expressão de PD-L1						
Sim	18	9	50,0	0,92	0,41-2,09	0,836
Não	30	15	50,0	1	0,50-2,61	
Expressão de PD-L1						
Sem expressão	30	15	50,0	1		
1-50%	15	7	46,7	0,84	0,34-2,06	0,704
51-100%	3	2	66,7	1,34	0,34-2,06	0,696
Classificação PD-L1 de acordo com Reddy et al (2017)						
Negativo	30	15	50,0	1		

1ª	14	7	50,0	0,92	0,37-3,36	0,856
1B	1	0	0,0	0,00	0,00-0,00	0,980
2A	1	1	100,0	1,58	0,21-12,06	0,657
2B	2	1	50,0	1,16	0,15-8,83	0,884
PD-L1 expressão e intensidade						
Negativo	30	15	50,0	1		
1A e 1B	15	7	46,7	0,84	0,34-2,06	0,704
2A e 2B	3	2	66,7	1,34	0,31-5,88	0,696
Heterogeneidade da expressão de PD-L1						
Sim	2	0	0,0	0,04		
Não	48	24	50,0	1	0,00-105,96	0,435
Intensidade da expressão de PD-L1						
Sem expressão	30	15	50,0	1		
Fraco	15	8	53,7	0,97	0,41-2,29	0,947
Moderado	3	1	64,0	0,63	0,08-4,79	0,657
Acentuado	0	0	-	-	-	-

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confiança; em negrito os valores de $p < 0,05$.

ANEXO A – Ficha de aprovação no CEP

	INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER/ INCA/ RJ	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Investigação do Padrão de Mutação do EGFR em Casos de Câncer Cervical Epidermóide e Adenocarcinoma		
Pesquisador: Michelle Marques Lessa Torres		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 17361013.8.0000.5274		
Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa Clínica e Incorporação Tecnológica		
Patrocinador Principal: Coordenação de Pesquisa Clínica e Incorporação Tecnológica		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 339.039		
Data da Relatoria: 22/07/2013		
Apresentação do Projeto:		
<p>Mundialmente, o câncer cervical (CC) é câncer ginecológico mais frequente e é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres. Para o ano de 2013 estima-se que 17.540 novos casos e 4.986 mortes decorrentes do CC ocorram no Brasil. A prevenção é uma das ações mais importantes para a estagnação do crescimento do número de mulheres que desenvolverão o CC, mas um diagnóstico precoce e um tratamento eficaz são fundamentais para a diminuição da morbidade e da mortalidade relacionados a essa doença. O desenvolvimento e a progressão do CC estão diretamente relacionados à infecção pelo HPV, apesar desse não ser o único fator relacionado ao CC. Alguns outros fatores também contribuem para a progressão do CC, por exemplo, o fator de crescimento epidérmico (EGFR) que é importante no processo do crescimento do tumor, na proliferação celular, na inibição da apoptose e no processo de metástases (Longatto-Filho, 2009). No câncer de pulmão, principalmente o de não-pequenas células, a presença de mutação que ocorre no EGFR resulta numa super expressão do mesmo e isso é fator determinante para o prognóstico, evolução e tratamento do paciente. O uso de monoterapia específica contra o EGFR e o tratamento personalizado no câncer de pulmão têm proporcionado benefícios aos pacientes. O avanço da medicina personalizada e baseada em informações genéticas tem mudado o curso de várias doenças. Apesar do CC ser facilmente prevenível e ter tratamento sem alta complexidade</p>		
Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203		
Bairro: CENTRO	Município: RIO DE JANEIRO	CEP: 20.231-092
UF: RJ		
Telefone: (21)3207-4550	Fax: (21)3207-4556	E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 339.039

para estágios iniciais, é dificilmente tratável em estágios avançados e sua recorrência é freqüente. E os dois tipos mais comuns do CC são o epidermóide e o adenocarcinoma. Alguns estudos avaliaram a expressão e a mutação do EGFR no CC; apesar de quase todos os estudos serem baseados no carcinoma epidermóide, no geral, de 25%-70% dos CCs têm EGFR super expressos. Em estudos que avaliaram somente os adenocarcinomas, a expressão elevada varia de 33-43%. Assim como no câncer de pulmão, o EGFR pode ser um importante alvo no tratamento do CC. Embora a super expressão do EGFR não esteja diretamente relacionada à mutação do EGFR e o processo que leva a essa super expressão ainda não ter sido elucidado no CC, um estudo demonstrou que 36% dos casos de carcinoma epidermóide apresentam mutação do EGFR. Com efeito, nenhum estudo conseguiu demonstrar a mutação do EGFR no adenocarcinoma. Decorrente da informação que a atividade do EGFR está elevada na maioria dos casos de CC, alguns ensaios clínicos com medicamentos específicos contra a ação do EGFR têm sido realizados em pacientes com CC. Em virtude dos resultados ainda não serem promissores, os pesquisadores propõem como hipótese, que só na presença da mutação do EGFR é que a terapia específica contra o EGFR é eficaz. Na literatura, não há um consenso com relação à presença, freqüência e conseqüências da mutação do EGFR no CC. A maioria dos estudos relata não ter encontrado essa mutação em nenhuma das amostras avaliadas. Longatto-Fillo et al, 2009 avaliaram 30 pacientes com carcinoma adenoepidermóide e nenhum apresentou mutação no EGFR. Da mesma forma, Arias-Piulito et al, 2008 testaram 80 pacientes com CC (75 carcinoma epidermóide e adenocarcinoma) e 0% apresentou mutação no EGFR. Lida et al, 2011 avaliaram 32 epidermóide e nenhum tinha essa mutação. Semelhantemente, Hamdani et al, 2010 observaram 53 pacientes com CC epidermóide sem que pudesse encontrar esta mutação específica. Todavia, nota-se com atenção, o fato de Write et al, 2012 detectaram mutação do EGFR em 9 dos 25 casos de CC epidermóide avaliados. Atualmente, no câncer de pulmão, o tratamento específico para pacientes com mutação no EGFR é utilizado com sucesso. Vislumbra-se, portanto, uma possibilidade de tratamento personalizado também para pacientes com CC e mutação no EGFR e como Write et al, 2012 demonstraram esta mutação pode estar presente em um grupo seletivo de paciente com CC. Faz-se mister uma extensivamente investigação quanto ao fato citado. Todos os estudos disponíveis até hoje têm limitações importantes como, pequena amostra, diferentes técnicas de avaliação e critérios de inclusão e exclusão inconsistentes. Um estudo amplo, com uma maior amostragem e uma padronização no diagnóstico e tratamento, é fundamental para ter-se uma resposta definitiva com relação à presença ou ausência da mutação do EGFR no CC. Mesmo que essa mutação não esteja presente na maioria dos pacientes, se alguma parcela dos CCs apresentar essa mutação já é uma

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 338.036

possibilidade da descoberta de uma população alvo que poderá se beneficiar de tratamento específico e eficaz contra o EGFR. Esse estudo visa explorar amplamente a dicotomia na literatura com relação à presença da mutação do EGFR no CC. O nosso grupo de pesquisa tem realizado inúmeros projetos nesse tópico e a nossa vasta experiência será de grande valia para trazer uma resposta definitiva para essa questão que atualmente, tem resultados divergentes na literatura. Já com o intuito de focar nesse tópico, a Angélica et al, do nosso grupo de pesquisa, avaliaram 38 pacientes com carcinoma epidermóide do colo de útero e 84.3% apresentavam expressão de EGFR, sendo em intensidade de 2 ou 3+ em 13% delas, mas nenhum deles apresentou mutação nesse gene. O CC é um problema de saúde pública e um estudo que visa responder uma importante questão do CC que tem a possibilidade de, num futuro próximo, se fazer uso de um tratamento personalizado e eficaz (com inibidores de EGFR) para pacientes que apresentem a mutação do EGFR é de extrema importância. O fato de vislumbrarmos uma terapêutica que traga resultados positivos, por mais que seja por uma parcela dos pacientes com CC, já um grande avanço para um tratamento mais eficiente para os paciente que sofre de CC.

Justificativa do estudo:

Assim como no câncer de pulmão, se a mutação no EGFR estiver presente, mesmo que em subgrupo dos casos com CC, um tratamento personalizado com inibidores de EGFR pode trazer grande benefício para esses pacientes. Pela elevada mortalidade do CC, a busca de uma população alvo para um tratamento específico poderá mudar o curso da doença para os portadores de mutação no EGFR.

Metodologia Proposta:

Com a finalidade de testar nossa hipótese diagnóstica, nós planejamos realizar uma coorte retrospectiva com pacientes diagnosticados com CC dos tipos epidermóide e adenocarcinoma (figure 1). 200 pacientes (CC tipo epidermóide) e 200 pacientes (CC adenocarcinomas) serão testados para mutação do EGFR. Todos os 400 serão acompanhados quanto ao desfecho clínico. Considerando um erro alfa de 5% e um poder estatístico de 80%, serão necessários, no mínimo, 151 casos de adenocarcinoma e 151 de carcinoma epidermóide a fim de se detectar a presença de mutação em 36% da população analisada, com um limite de confiança de 5%. Considerando-se esses pressupostos e eventuais perdas por limitações de amostras, neste estudo serão analisados 400 pacientes com CC, sendo 200 com adenocarcinoma e 200 com carcinoma epidermóide. Abordagem Experimental: Nos últimos cinco anos, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), teve em

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 339.039

média 600 casos de CC por ano, dentre eles 80% são do tipo epidermóide e 20% são adenocarcinoma. Para testar a hipótese principal, planejamos analisar 400 pacientes, 200 com CC tipo epidermóide e 200 com CC tipo adenocarcinoma para a presença de expressão e mutação do EGFR. Para testar a hipótese secundária, iremos acompanhar esses pacientes para compararmos o tempo de vida sem progressão da doença de sobrevivência global. As variáveis que serão coletadas com a finalidade de avaliar a hipótese secundária serão variáveis clínicas e epidemiológicas. Uma ficha de coleta de dados eletrônica (eCRF) está sendo confeccionada pela equipe de gerenciamento de dados da Área Representativa de Pesquisa Clínica (ARPC/INCA), por meio do sistema OpenClinica Enterprise®. Esse sistema é utilizado desde janeiro de 2012 para gerenciamento de dados de todos os estudos investigador/patrocinador coordenados pela Coordenação de Pesquisa Clínica/INCA e está em concordância com as Boas Práticas Clínicas, resolução 466/12 e Instruções de Serviço da própria ARPC. As variáveis demográficas, clínicas e moleculares contidas na eCRF estão sendo selecionadas de acordo com os objetivos do protocolo. A única forma de identificação dos sujeitos de pesquisa na eCRF será o número do sujeito no protocolo, garantindo sua confidencialidade. O investigador principal será responsável pela inclusão dos dados na eCRF, sua completude e precisão. Os dados inseridos nas eCRFs e possíveis correções serão armazenadas no registro de auditoria do sistema OpenClinica Enterprise®. Backups dos dados armazenados nas eCRFs serão realizados diariamente pela Divisão de Informática do INCA. Seleção dos blocos: Após a seleção de pacientes, os blocos de CC serão cortados em lâminas e serão corados com hematoxilina e eosina para a revisão patológica. A revisão patológica irá confirmar o diagnóstico (epidermóide ou adenocarcinoma), a quantidade de tecido disponível para a extração de DNA e porcentagem de câncer no bloco; apenas áreas com mais de 80% de câncer será utilizada para a extração do DNA. Extração de DNA: A extração do DNA será feita em blocos de parafina utilizando o KIT Nucleospin (Macherey-Nage), seguindo as orientações do fabricante. Ou alternativamente, utilizando o kit o kit All Prep RNA/DNA/Protein mini da Qiagen Inc, seguindo as instruções dos fabricante.

Critério de Inclusão:

- 1) Paciente acima de 18 anos
- 2) Diagnóstico patológico de CC do tipo epidermóide ou adenocarcinoma
- 3) Blocos de parafina disponíveis para coleta de material
- 4) Acompanhamento do curso da doença no INCA

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 339.039

Critério de Exclusão:

- 1) Paciente que apresenta outro tipo câncer concomitante ao CC
- 2) Paciente que já participaram de pesquisa de colo de útero com uso de drogas experimentais para tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar a prevalência de pacientes com CC que apresentam mutação no EGFR.

Objetivo Secundário:

Verificar se esse grupo seletivo que apresenta mutação no EGFR irá evoluir com um menor tempo de vida sem progressão da doença e uma menor sobrevida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Nenhum dos pacientes participante sofrerá risco. As informações apresentadas salvaguardando os interesses dos doadores do material, sua imagem e sua privacidade e que todas as informações serão registradas de forma sigilosa em formulário padronizado, que abrange dados sobre o diagnóstico, fatores prognósticos, tratamento e desfecho clínico.

Benefícios:

Os participantes não gozarão de nenhum benefício. O único benefício desse projeto é um maior conhecimento sobre a mutação do EGFR no câncer do colo do útero.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e exequível nos moldes apresentados.

Metodologia corretamente descrita e com condições de realização.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos em conformidade.

Recomendações:

Rever digitação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 339.039

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/96, manifesta-se pela não aprovação do projeto de pesquisa nos termos em que está proposto.

RIO DE JANEIRO, 23 de Julho de 2013

Assinador por:
Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

Página 06 de 06

Justificativa da Ausência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do projeto: Investigação do Padrão de Mutação do EGFR em Casos de Câncer Cervical Epidermóide e Adenocarcinoma

Nome do Investigador Principal: Michelle Marques Lessa Torres

A Resolução 196/96 é explícita no que se refere ao TCLE, enfatizando que os sujeitos da pesquisa devam ser resguardados nos seus direitos, quando submetidos a qualquer tipo de procedimento que envolva sua participação.

Segundo a Resolução, "*nos casos em que seja impossível registrar o consentimento livre e esclarecido, tal fato deve ser devidamente documentado, com explicação das causas da impossibilidade, e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa*" (Res. CNS 196/96-IV,3.c).

Por esse motivo, viemos por meio deste documento justificar por escrito a ausência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto supracitado.

Por se tratar de um estudo retrospectivo onde usaremos blocos de patologia já armazenados no INCA (no setor da anatomia patologia), sem a coleta de nenhum material novo e com o objetivo de verificar a presença ou ausência de uma mutação que não está relacionada ao tratamento da doença, os autores solicitam dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, garantindo sigilo das informações coletadas assegurando desta forma a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Da mesma forma, nenhuma das informações obtidas por meio da pesquisa, implicará no tratamento da paciente.

Os pesquisadores e a sua chefia imediata (Dr. Carlos Gil Ferreira) assumem a responsabilidade pelas informações apresentadas salvaguardando os interesses dos doadores do material, sua imagem e sua privacidade e que todas as informações serão registradas de forma sigilosa em formulário padronizado, que abrange dados sobre o

diagnóstico, fatores prognósticos, tratamento e desfecho clínico; também a chefia da anatomia patologia, onde nos blocos estão armazenados, Dr. Ivanir Martins, consente com a sua utilização.



Pesquisador Responsável (Michelle M. L. Torres)

20/06/2015

Data





Chefe da Pesquisa Clínica (Carlos Gil Ferreira)

20/06/2013

Data



Chefe da Anatomia Patologia (Ivanir Martins)

20/06/2013

Data



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER JOSÉ ALENCAR
GOMES DA SILVA - INCA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação do Padrão de Mutação do EGFR em Casos de Câncer Cervical Epidermóide e Adenocarcinoma

Pesquisador: Michelle Marques Lessa Torres

Área Temática:

Versão: 10

CAAE: 17361013.8.0000.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa Clínica e Incorporação Tecnológica

Patrocinador Principal: Coordenação de Pesquisa Clínica e Incorporação Tecnológica

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.462.384

Apresentação do Projeto:

- Projeto de Pesquisa aprovado pelo Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 390.338, datado de 10 de Setembro de 2013.

- A presente Emenda tem a seguinte JUSTIFICATIVA:

Investigação do padrão da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer do colo do útero do INCA. A estratégia de combate ao câncer por meio da manipulação da resposta do sistema imunológico tem trazido respostas promissoras. O primeiro uso terapêutico se deu pela imunológica, em 2011 e após esse início, terapias imunológicas promissoras, visando moléculas de controle de imunidade, têm levado a melhores resultados de sobrevida em vários tipos de malignidade incluindo os cânceres de pulmão, melanoma e câncer de bexiga (HERBST et al., 2014; POWLES et al., 2014) por atingirem curas clínicas completas e duradouras (PENNOCK; CHOW, 2015; SHARMA; ALLISON, 2015). Tratamentos, como CTLA-4 e PD-1 expressa em células T ativadas, neutralizam a ação imunossupressora na célula cancerígena no microambiente tumoral (HEEREN et al., 2016). A excitação em relação às imunoterapias, tais como anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1, foi decorrente de respostas clínicas favoráveis obtidas em doentes com diversos tipos avançados de câncer. Esse novo perfil de sobrevivência agora levanta questões sobre como aumentar o número de pacientes que receberão benefício clínico a longo prazo e como predizer os pacientes que responderão positivamente (TENG, et al., 2015). Atualmente, o eixo PD-1/PD-L1 é alvo

Endereço: RUA DO RESENDE, 126 - SALA 203

Bairro: CENTRO

CEP: 20.231-092

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3207-4550

Fax: (21)3207-4556

E-mail: cep@inca.gov.br

Continuação do Parecer: 2.492.384

imunoterapêutico em vários tipos de câncer, mas informações significativas da expressão de PD-L1 e PD-1 no câncer cervical ainda estão sendo estudadas. Em alusão ao que ocorre em um grupo de pacientes com melanoma e expressão positiva de PD-L1, vislumbra-se, a possibilidade de tratamento personalizado também para pacientes com CC diante de uma possível expressão de PD-L1 e PD-1. Com isso, faz-se mister a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de CC. Para a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer de colo do útero já utilizados nesse projeto de pesquisa a técnica de escolha é a imunohistoquímica no material já disponível.

- HEEREN, A. M. et al. Prognostic effect of different PD L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern pathology*, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 753-763, 2016.
- HENGST, L.; REED, S. I. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Heidelberg, v. 227, p. 25-41, 1998.
- POWLES, T. et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, London, v. 515, p. 558-562, 2014.
- PENNOCK, G. K.; CHOW, L. Q. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. *Oncologist*, Dayton, v. 20, n. 7, p. 812-822, 2015.
- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, New York, v. 348, p. 56-61, 2015
- TENG, M. W. et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, Baltimore, v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 2015.

Objetivo da Pesquisa:

- A presente Emenda tem a seguinte JUSTIFICATIVA:

Investigação do padrão da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer do colo do útero do INCA A estratégia de combate ao câncer por meio da manipulação da resposta do sistema imunológico tem trazido respostas promissoras. O primeiro uso terapêutico se deu pela imunológica, em 2011 e após esse início, terapias imunológicas promissoras, visando moléculas de controle de imunidade, têm levado a melhores resultados de sobrevida em vários tipos de malignidade incluindo os cânceres de pulmão, melanoma e câncer de bexiga (HERBST et al., 2014; POWLES et al., 2014) por atingirem curas clínicas completas e duradouras (PENNOCK; CHOW, 2015; SHARMA; ALLISON, 2015). Tratamentos, como CTLA-4 e PD-1 expressa em células T ativadas, neutralizam a ação imunossupressora na célula cancerígena no microambiente tumoral (HEEREN et al., 2016). A excitação em relação às imunoterapias, tais como anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1,

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

Continuação do Parecer: 2.452.384

foi decorrente de respostas clínicas favoráveis obtidas em doentes com diversos tipos avançados de câncer. Esse novo perfil de sobrevivência agora levanta questões sobre como aumentar o número de pacientes que receberão benefício clínico a longo prazo e como prever os pacientes que responderão positivamente (TENG, et al., 2015). Atualmente, o eixo PD-1/PD-L1 é alvo imunoterapêutico em vários tipos de câncer, mas informações significativas da expressão de PD-L1 e PD-1 no câncer cervical ainda estão sendo estudadas. Em alusão ao que ocorre em um grupo de pacientes com melanoma e expressão positiva de PD-L1, vislumbra-se, a possibilidade de tratamento personalizado também para pacientes com CC diante de uma possível expressão de PD-L1 e PD-1. Com isso, faz-se mister a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de CC. Para a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer de colo do útero já utilizados nesse projeto de pesquisa a técnica de escolha é a imunohistoquímica no material já disponível.

- HEEREN, A. M. et al. Prognostic effect of different PD L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern pathology*, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 753-763, 2016.
- HENGST, L.; REED, S. I. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Heidelberg, v. 227, p. 25-41, 1998.
- POWLES, T. et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, London, v. 515, p. 558-562, 2014.
- PENNOCK, G. K.; CHOW, L. Q. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. *Oncologist*, Dayton, v. 20, n. 7, p. 812-822, 2015.
- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, New York, v. 348, p. 56-61, 2015
- TENG, M. W. et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, Baltimore, v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- A presente Emenda tem a seguinte JUSTIFICATIVA:

Investigação do padrão da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer do colo do útero do INCA. A estratégia de combate ao câncer por meio da manipulação da resposta do sistema imunológico tem trazido respostas promissoras. O primeiro uso terapêutico se deu pela imunológica, em 2011 e após esse início, terapias imunológicas promissoras, visando moléculas de controle de imunidade, têm levado a melhores resultados de sobrevida em vários tipos de malignidade incluindo os cânceres de pulmão, melanoma e câncer de bexiga (HERBST et al., 2014);

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: osp@inca.gov.br

Continuação do Parecer: 2.462.384

POWLES et al., 2014) por atingirem curas clínicas completas e duradouras (PENNOCK; CHOW, 2015; SHARMA; ALLISON, 2015). Tratamentos, como CTLA-4 e PD-1 expressa em células T ativadas, neutralizam a ação imunossupressora na célula cancerígena no microambiente tumoral (HEEREN et al., 2016). A excitação em relação às imunoterapias, tais como anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1, foi decorrente de respostas clínicas favoráveis obtidas em doentes com diversos tipos avançados de câncer. Esse novo perfil de sobrevivência agora levanta questões sobre como aumentar o número de pacientes que receberão benefício clínico a longo prazo e como prever os pacientes que responderão positivamente (TENG, et al., 2015). Atualmente, o eixo PD-1/PD-L1 é alvo imunoterapêutico em vários tipos de câncer, mas informações significativas da expressão de PD-L1 e PD-1 no câncer cervical ainda estão sendo estudadas. Em alusão ao que ocorre em um grupo de pacientes com melanoma e expressão positiva de PD-L1, vislumbra-se, a possibilidade de tratamento personalizado também para pacientes com CC diante de uma possível expressão de PD-L1 e PD-1. Com isso, faz-se mister a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de CC. Para a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer de colo do útero já utilizados nesse projeto de pesquisa a técnica de escolha é a imunohistoquímica no material já disponível.

- HEEREN, A. M. et al. Prognostic effect of different PD L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern pathology*, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 753-763, 2016.

- HENGST, L.; REED, S. I. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Heidelberg, v. 227, p. 25-41, 1998.

- POWLES, T. et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, London, v. 515, p. 558-562, 2014.

- PENNOCK, G. K.; CHOW, L. Q. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. *Oncologist*, Dayton, v. 20, n. 7, p. 812-822, 2015.

- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, New York, v. 348, p. 56-61, 2015 TENG, M. W. et al.

- Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, Baltimore, v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- A presente Emenda tem a seguinte JUSTIFICATIVA:

Investigação do padrão da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer do colo do útero do INCA A estratégia de combate ao câncer por meio da manipulação da resposta do sistema

Endereço: RUA DO RESENDE, 126 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 2.462.384

imunológico tem trazido respostas promissoras. O primeiro uso terapêutico se deu pela imunológica, em 2011 e após esse início, terapias imunológicas promissoras, visando moléculas de controle de imunidade, têm levado a melhores resultados de sobrevida em vários tipos de malignidade incluindo os cânceres de pulmão, melanoma e câncer de bexiga (HERBST et al., 2014; POWLES et al., 2014) por atingirem curas clínicas completas e duradouras (PENNOCK; CHOW, 2015; SHARMA; ALLISON, 2015). Tratamentos, como CTLA-4 e PD-1 expressa em células T ativadas, neutralizam a ação imunossupressora na célula cancerígena no microambiente tumoral (HEEREN et al., 2016). A excitação em relação às imunoterapias, tais como anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1, foi decorrente de respostas clínicas favoráveis obtidas em doentes com diversos tipos avançados de câncer. Esse novo perfil de sobrevivência agora levanta questões sobre como aumentar o número de pacientes que receberão benefício clínico a longo prazo e como prever os pacientes que responderão positivamente (TENG, et al., 2015). Atualmente, o eixo PD-1/PD-L1 é alvo imunoterapêutico em vários tipos de câncer, mas informações significativas da expressão de PD-L1 e PD-1 no câncer cervical ainda estão sendo estudadas. Em alusão ao que ocorre em um grupo de pacientes com melanoma e expressão positiva de PD-L1, vislumbra-se, a possibilidade de tratamento personalizado também para pacientes com CC diante de uma possível expressão de PD-L1 e PD-1. Com isso, faz-se mister a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de CC. Para a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer de colo do útero já utilizados nesse projeto de pesquisa a técnica de escolha é a imunohistoquímica no material já disponível.

- HEEREN, A. M. et al. Prognostic effect of different PD L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern pathology*, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 753-763, 2016.

- HENGST, L.; REED, S. I. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Heidelberg, v. 227, p. 25-41, 1998.

- POWLES, T. et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, London, v. 515, p. 558-562, 2014.

- PENNOCK, G. K.; CHOW, L. Q. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. *Oncologist*, Dayton, v. 20, n. 7, p. 812-822, 2015.

- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, New York, v. 348, p. 56-61, 2015 TENG, M. W. et al.

- Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, Baltimore, v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 2015.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4560 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 2.462.384

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- A presente Emenda tem a seguinte JUSTIFICATIVA:

Investigação do padrão da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer do colo do útero do INCA A estratégia de combate ao câncer por meio da manipulação da resposta do sistema imunológico tem trazido respostas promissoras. O primeiro uso terapêutico se deu pela imunológica, em 2011 e após esse início, terapias imunológicas promissoras, visando moléculas de controle de imunidade, têm levado a melhores resultados de sobrevida em vários tipos de malignidade incluindo os cânceres de pulmão, melanoma e câncer de bexiga (HERBST et al., 2014; POWLES et al., 2014) por atingirem curas clínicas completas e duradouras (PENNOCK; CHOW, 2015; SHARMA; ALLISON, 2015). Tratamentos, como CTLA-4 e PD-1 expressa em células T ativadas, neutralizam a ação imunossupressora na célula cancerígena no microambiente tumoral (HEEREN et al., 2016). A excitação em relação às imunoterapias, tais como anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1, foi decorrente de respostas clínicas favoráveis obtidas em doentes com diversos tipos avançados de câncer. Esse novo perfil de sobrevivência agora levanta questões sobre como aumentar o número de pacientes que receberão benefício clínico a longo prazo e como predizer os pacientes que responderão positivamente (TENG, et al., 2015). Atualmente, o eixo PD-1/PD-L1 é alvo imunoterapêutico em vários tipos de câncer, mas informações significativas da expressão de PD-L1 e PD-1 no câncer cervical ainda estão sendo estudadas. Em alusão ao que ocorre em um grupo de pacientes com melanoma e expressão positiva de PD-L1, vislumbra-se, a possibilidade de tratamento personalizado também para pacientes com CC diante de uma possível expressão de PD-L1 e PD-1. Com isso, faz-se mister a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de CC. Para a investigação da expressão de PD-L1 e PD-1 nos casos de câncer de colo do útero já utilizados nesse projeto de pesquisa a técnica de escolha é a imunohistoquímica no material já disponível.

- HEEREN, A. M. et al. Prognostic effect of different PD L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern pathology*, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 753-763, 2016.

- HENGST, L.; REED, S. I. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Heidelberg, v. 227, p. 25-41, 1998.

- POWLES, T. et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, London, v. 515, p. 558-562, 2014.

- PENNOCK, G. K.; CHOW, L. Q. The evolving role of immune checkpoint inhibitors in cancer treatment. *Oncologist*, Dayton, v. 20, n. 7, p. 812-822, 2015.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 2.462.384

- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. Science, New York, v. 348, p. 56–61, 2015 TENG, M. W. et al.

- Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Research, Baltimore, v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 2015.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS Nº 466/2012 e na Norma Operacional CNS Nº 001/2013 manifesta-se pela aprovação da Emenda ao projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_904915 E7.pdf	08/01/2018 20:57:18		Aceito
Outros	autorização das amostras de SP.pdf	16/05/2014 12:04:35		Aceito
Outros	ADENDO AO CEP - Luisa Villa.doc	17/03/2014 09:06:40		Aceito
Outros	ADENDO AO CEP - Técnicas de avaliação da família HER.doc	24/02/2014 09:10:01		Aceito
Outros	Adendo ao CEP.doc	25/11/2013 09:56:21		Aceito
Outros	Emenda 1.doc	05/11/2013 13:34:02		Aceito
Outros	ADENDO RAS.doc	29/10/2013 13:49:26		Aceito
Outros	Justificativa Ausência TCLE.pdf	21/06/2013 15:59:02		Aceito
Outros	Formulário Submissão.pdf	21/06/2013 15:58:46		Aceito
Folha de Rosto	Folha Rosto.pdf	21/06/2013 15:57:10		Aceito

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER JOSÉ ALENCAR
GOMES DA SILVA - INCA



Continuação do Parecer: 2.462.384

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de pesquisa - Investigação do padrao de EGFR em câncer de colo de útero.doc	21/06/2013 15:55:09		Aceito
---	---	------------------------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Janeiro de 2018

Assinado por:

**Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)**

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

Página 08 de 08