

**Rafael Maciel Grochot**

**EXPRESSÃO DO PD-L1 EM NEOPLASIAS CERVICAIS E SEU  
IMPACTO EM SOBREVIDA ASSOCIADO À INFILTRAÇÃO  
LINFOCITÁRIA PERITUMORAL E À EXPRESSÃO DE FOXP3.**

Dissertação apresentada à Universidade de  
Caxias do Sul para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências da Saúde.

Caxias do Sul

2018

**Rafael Maciel Grochot**

**EXPRESSÃO DO PD-L1 EM NEOPLASIAS CERVICAIS E SEU  
IMPACTO EM SOBREVIDA ASSOCIADO À INFILTRAÇÃO  
LINFOCITÁRIA PERITUMORAL E À EXPRESSÃO DE FOXP3.**

Dissertação apresentada à Universidade de  
Caxias do Sul para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Doutor Fábio Firmbach  
Pasqualotto

Coorientadora: Professora Doutora Lessandra  
Michelin

Caxias do Sul

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

G873e Grochot, Rafael Maciel

Expressão do PD-L1 em neoplasias cervicais e seu impacto em  
sobrevida associado à infiltração linfocitária peritumoral e à expressão  
de FOXP3 / Rafael Maciel Grochot. – 2018.

50 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.

Orientação: Fabio Fimbach Pasqualotto.

Coorientação: Lessandra Michelim Rodriguez N. Veira.

1. Útero - Câncer. 2. Tumores. 3. Imunoterapia. I. Pasqualotto, Fabio  
Fimbach, orient. II. Veira, Lessandra Michelim Rodriguez N., coorient.  
III. Título.

CDU 2. ed.: 618.14-006

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PROF. DR. ASDRUBAL FALAVIGNA

**Rafael Maciel Grochot**

**EXPRESSÃO DO PD-L1 EM NEOPLASIAS CERVICAIS E SEU  
IMPACTO EM SOBREVIDA ASSOCIADO À INFILTRAÇÃO  
LINFOCITÁRIA PERITUMORAL E À EXPRESSÃO DE FOXP3.**

Presidente da banca:

Professor Doutor Fábio Firmbach Pasqualotto

Banca examinadora:

Professora Doutora Raquel Papandreu Dibbi

Professor Doutor André Borba Reiriz

Professora Doutora Angélica Regina Cappellari

**EXPRESSÃO DO PD-L1 EM NEOPLASIAS CERVICAIS E SEU IMPACTO EM SOBREVIVÊNCIA ASSOCIADO À INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA PERITUMORAL E À EXPRESSÃO DE FOXP3**

*Rafael Maciel Grochot*

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Linha de Pesquisa: Investigação Clínica e Epidemiológica

Caxias do Sul, 30 de julho de 2018.

Banca Examinadora:

Dra. Raquel Papandreu Dibbi  
UFCSPA

Dr. André Borba Reiriz  
UCS

Dra. Angélica Cappellari  
PUCRS

Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto  
UCS  
Orientador

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	IMUNOEDIÇÃO NEOPLÁSICA .....	1
1.2	CÂNCER x IMUNOTERAPIA .....	2
1.3	VIA PD-1/PD-L1 .....	3
1.4	BIOMARCADORES x CÂNCER .....	4
1.4.1	<b>PD-L1 como Biomarcador Preditivo</b> .....	5
1.5	CÂNCER DE COLO UTERINO .....	6
1.5.1	<b>Câncer de Colo Uterino x Sistema Imune</b> .....	7
1.6	OBJETIVO .....	10
<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	11
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	25
3.1	INTRODUÇÃO .....	25
3.2	METODOLOGIA .....	26
3.2.1	<b>Pacientes</b> .....	26
3.2.2	<b>Materiais</b> .....	27
3.2.3	<b>Aspectos Éticos</b> .....	29
3.2.4	<b>Aspectos Estatísticos</b> .....	29
3.3	RESULTADOS .....	29
3.3.1	<b>Pacientes</b> .....	29
3.3.2	<b>Avaliação Tumoral Cervical</b> .....	31
3.3.3	<b>Infiltrados Linfocitários Peritumorais</b> .....	32
3.4	DISCUSSÃO .....	33
3.4.1	<b>Avaliação Tumoral Cervical</b> .....	33
3.4.2	<b>Infiltrados Linfocitários Peritumorais</b> .....	35
3.5	CONCLUSÃO .....	39
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	41

## Lista de Siglas e Abreviaturas

IC: intervalo de confiança

INCA: Instituto Nacional do Câncer

HPV: Papilomavírus humano

DNA: ácido desoxirribonucleico

pRb: proteína do retinoblastoma

G1: fase gap 1

G2: fase gap 2

S: fase de síntese

M: fase mitótica

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

Th1: linfócitos T auxiliares tipo 1

Treg: linfócitos T regulatórios

Foxp3: *forkhead box P3*

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IFN- $\gamma$ : interferon gama

MHC: *major histocompatibility complex*; complexo maior de histocompatibilidade

IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase

PD-1: *programmed (cell) death 1*

PD-L1: *programmed (cell) death 1 ligand 1*

CTLA-4: antígeno associado ao linfócito T citotóxico-4

NCI: *National Cancer Institute*

PS: Performance Status

EC: Estadio Clínico

Esta dissertação de Mestrado Acadêmico Stricto Sensu é apresentada no formato exigido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Caxias do Sul. A mesma é constituída da secção de “Introdução com referências bibliográficas”, a inclusão do artigo original submetido/publicado em periódico Qualis A na classificação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES), e as “Considerações Finais e Perspectivas”.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMUNOEDIÇÃO NEOPLÁSICA

Há mais de cem anos, dispõe-se de evidências da relação entre o sistema imune e neoplasias (1,2). Na década de 50, a hipótese de imunovigilância do câncer foi formalmente postulada por *Sir Macfarlane Burnet* e *Lewis Thomas* para descrever uma possível função da imunidade celular adaptativa associada à erradicação de células neoplásicas (3,4). A demonstração de imunidade induzida por carcinógenos, em modelos xenógrafos, estabeleceu a existência de antígenos tumor-específicos e, conseqüentemente, concluiu-se que a viabilidade da imunovigilância era dependente do reconhecimento de estruturas específicas em células tumorais pelo sistema imune (5).

A reprodução do conceito de que o sistema imune pode reconhecer e eliminar o desenvolvimento primário de tumores, mesmo na ausência de intervenção terapêutica, permaneceu, por muito tempo, inconclusiva, de modo a manter a biologia celular tumoral como foco das pesquisas e linha de frente das estratégias terapêuticas (6,7). Ao final dos anos 90, voltou-se a atenção para pacientes imunossupressos após transplantes e primariamente imunodeficientes ao parecerem portar risco relativo significativamente maior para o desenvolvimento de neoplasias. Inicialmente, atribuiu-se o fato às neoplasias vírus-associadas – Epstein-Barr, HPV, HIV; posteriormente, melanomas, neoplasias colorretais, pancreáticas e uroteliais também passaram a ser observadas no cenário imunodeficiente (8,9). Concomitantemente a estes dados epidemiológicos, análises histológicas retrospectivas passaram a sugerir correlação positiva entre sobrevida e presença de linfócitos em espécimes tumorais – primariamente em melanomas e, mais tarde, resultados semelhantes foram observados em neoplasias de mama (10), bexiga (11), cólon e reto (12).

Entretanto, a despeito das evidências em cenários de depleção imune, tumores ainda eram diagnosticados na vigência de imunocompetência, sugerindo que a hipótese original de imunovigilância não elucidava, completamente, a relação câncer x sistema imune (6,13). Recentemente, demonstrou-se que o sistema imune não somente protege o hospedeiro contra o desenvolvimento tumoral, mas, também, paradoxalmente, pode promovê-lo (14–16).

## 1.2 CÂNCER x IMUNOTERAPIA

Ao considerar-se o microambiente tumoral como fator carcinogênico, transgrediu-se o paradigma do tratamento oncológico contemporâneo (17,18). Os mecanismos fundamentais da imunoterapia diferem consideravelmente das estratégias antineoplásicas clássicas. Em oposição aos agentes quimioterápicos citotóxicos e das terapias-alvo, agentes imunoterápicos promovem respostas dinâmicas, não limitadas à especificidade de desordens oncogênicas pontuais ou outras habilidades neoplásicas autonômicas (19,20). O objetivo da imunoterapia é iniciar ou reativar um ciclo autossustentável de imunidade anticâncer; terapias imunes devem, portanto, superar mecanismos intrínsecos de *feedback* negativo. Entretanto, a indução de amplificação do ciclo câncer-imunidade pode gerar respostas antitumorais às custas de toxicidade para células saudáveis (21). O sistema imune lembra seus alvos, sugerindo que as respostas antitumorais podem ser de longa duração (22).

A velocidade dos estudos clínicos com agentes imunoterápicos ultrapassou o progresso de compreensão de ciência básica – respostas clínicas superaram racionais biológicos. Entretanto, este cenário oportunizou a combinação das evidências científicas emergentes com *insights* clínicos de maneira sinérgica, de modo a se aperfeiçoar o conhecimento da relação sistema imune x câncer (19,23).

Durante os últimos cinco anos, órgãos reguladores aprovaram inúmeras estratégias consideradas imunoterapias – a maioria das quais alvejam os eixos CTLA-4 e PD-1/PD-L1 (24); todavia, múltiplas outras vias de *checkpoints* imunes estão em investigação em cenários pré-clínicos (25). Estudos de fase I/II com ipilimumab, um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, foram iniciados no final dos anos 90 e, conforme esperado, geraram respostas objetivas em diversas histologias tumorais (26–29) mais tarde reproduzidas em estudos de fase III, com impacto em sobrevida global (30). Anticorpos dirigidos à via PD-1/PDL1 também demonstraram êxito antineoplásico; respostas objetivas de até 38% já foram registradas. O prolongamento de sobrevida global observado em estudos de fase III e remissões sustentadas em estudos de fase II viabilizaram a aprovação destes agentes em melanoma, câncer de pulmão não-pequenas células (22,31–35), carcinoma urotelial (36–39), carcinoma renal (40), carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (41,42) e, recentemente, neoplasias com

instabilidade microssatélite (43,44). Observados os distintos mecanismos regulados por ambas as vias, bem como os mecanismos de ação não sobrepostos entre os anticorpos monoclonais, a eficácia da terapia combinada também já foi demonstrada (45).

Apesar de respostas clínicas impressionantes – e consequente sucesso comercial –, a taxa de pacientes respondedores ainda é baixa e nem todos os respondedores assim permanecem indeterminadamente; portanto, terapias mais eficientes e eficazes devem ser desenvolvidas para ativação do sistema imune hospedeiro, limitando os efeitos colaterais da imunotoxicidade (46). Atualmente, a comunidade científica oncológica enfrenta dilemas na seleção entre as múltiplas tecnologias contemporâneas antineoplásicas pesando indicação, histologias, combinações, sequenciamentos – fardo econômico, inclusive: o custo é proibitivo para seu acesso indiscriminado (24). É iminente a identificação dos pacientes potencialmente respondedores e da dependência de resposta a perfis moleculares tumorais específicos; torna-se imperativa a busca por biomarcadores que predigam benefício terapêutico (24,47).

Ainda, a resistência à imunoterapia também difere dos mecanismos tradicionais de resistência a drogas anticâncer e parece ser discrepante entre os fenótipos tumorais inflamatórios (46). A resolução das resistências intrínseca e adquirida à terapia de inibição de *checkpoints* representa os próximos alvos da pesquisa básica (24,48).

### 1.3 VIA PD-1/PD-L1

O *checkpoint* imune mais amplamente explorado envolve a via PD-1/PD-L1 – outrora a aquisição desde conhecimento seja relativamente recente: a identificação do PD-1 data de 1992, enquanto o PD-L1 foi identificado em 2000(49).

As primeiras evidências da via PD-1/PD-L1 como *checkpoint* imune inibitório fisiológico foram observadas *in vitro*. A imunoglobulina humana PD-L1 inibiu a proliferação de linfócitos (murinos) T ativados PD-1+/+, evento não observado em linfócitos PD-1-/-; a análise em células humanas revelou um decréscimo proliferativo de 69% à interação linfocitária com o PD-L1 (50). Seu envolvimento supressor na ativação e/ou proliferação de células T foi corroborado por modelos xenográficos; patologias autoimunes passaram a ser observadas em roedores PD-1-deficientes (PDCD1-/-) (51).

Hipotetizou-se, então, que sua subversão poderia constituir um poderoso mecanismo de evasão imune por neoplasias (1,25,52,53). Expressivas respostas imunes antineoplásicas foram observadas à inoculação de células tumorais em roedores PDCD1-/- (54,55) e ensaios pré-clínicos demonstraram que a indução transgênica da expressão do PD-L1 em tumores tornou-os significativamente menos suscetíveis à lise celular citotóxica (56). A ampla expressão do PD-L1 avaliada, retrospectivamente, em microambientes tumorais e sua relação com parâmetros clínico-patológicos conduziram os estudos desta via regulatória de sinalização como potencial alvo terapêutico antineoplásico (57,58).

#### 1.4 BIOMARCADORES x CÂNCER

O termo biomarcador representa uma característica que é objetivamente aferida e avaliada como indicador de desfecho (59,60). Especificamente, em oncologia (61):

- a) Biomarcadores prognósticos: fornecem informações sobre desfecho (recorrência, progressão de doença, óbito), independente de terapia; refletem a história natural da biologia tumoral, sem intervenção iatrogênica (62,63);
- b) Biomarcadores preditivos: identificam indivíduos com maiores chances (comparativamente a outros indivíduos, que não portem o biomarcador) de apresentarem efeito favorável (resposta) ou desfavorável (toxicidade) após exposição a agente terapêutico (60,62). O biomarcador pode, inclusive, tornar-se alvo terapêutico (63). Do ponto de vista estatístico, um equívoco frequente ocorre quando investigadores comparam desfechos ao analisarem a expressão de biomarcadores dentre todos os indivíduos expostos à terapia (a exemplo do que ocorre em estudos de fase II); ao não haver grupo controle, um teste estatístico formal para interação entre tratamento e biomarcador torna-se inviável (60).

Referente à sua aplicabilidade, biomarcadores podem ser (64–66):

- a) *Companion diagnostic*: essenciais para uso seguro e eficaz de terapias; determinantes para terapêutica;

b) *Complementary diagnostic*: informativos, auxiliam na tomada de decisão terapêutica, pesando riscos e benefícios, mas sem restringir acesso à terapia.

Muitos pacientes ainda recebem terapia anticâncer da qual não se beneficiam, sendo expostos, exclusivamente, à toxicidade. Por este motivo, há um vigente e crescente interesse na elucidação de biomarcadores na tentativa de aprimorar desfechos mediante melhor seleção de pacientes (63). Em 2015, Lopes et al. avaliaram o êxito do teste de fármacos em estudos clínicos quando baseados – ou não – no uso de biomarcadores. A análise de mais de 10 000 manuscritos e 1 079 drogas revelou forte efeito do uso de biomarcadores na otimização de estudos clínicos: a taxa de sucesso no desenvolvimento farmacológico biomarcador-associado foi de 24% *versus* 6% de êxito observado em drogas que não lançaram mão desta estratégia ( $p = 0,026$ ) (67).

#### **1.4.1 PD-L1 como Biomarcador Preditivo**

Apesar de impressionantes resultados clínicos obtidos com agentes imunoterápicos, a eficácia e efetividade destas estratégias variam substancialmente entre pacientes e histologias (68). É iminente a identificação de biomarcadores, na tentativa de selecionar pacientes que possam, potencialmente, apresentar respostas terapêuticas objetivas.

Baseando-se no racional biológico da via PD-1/PD-L1, a avaliação do PD-L1 como potencial biomarcador preditivo foi explorada desde as fases iniciais dos primeiros estudos clínicos com inibidores de *checkpoint* imunes (68,69). Brahmer et al., em 2010, reportaram os resultados do primeiro estudo de fase I com um agente anti-PD-1 em 39 pacientes com tumores sólidos avançados – melanoma, câncer de pulmão não-pequenas células, carcinoma renal de células claras, câncer de próstata e câncer colorretal. Nove espécimes foram avaliados para expressão do PD-L1; quatro foram considerados positivos: três sofreram regressão tumoral e o quarto paciente foi randomizado para a coorte de dose farmacológica em que respostas não foram observadas. Nenhum dentre os cinco pacientes PD-L1-negativos apresentaram benefício terapêutico (70). Em 2012, Topalian et al. conduziram um novo estudo de fase

I, de desenho idêntico ao estudo publicado em 2010, incluindo 296 pacientes. Ao estabelecerem 5% como valor de referência para marcação imuno-histoquímica de PD-L1 em células neoplásicas, respostas objetivas foram observadas em nove (36%) dos 25 pacientes PD-L1-expressores; nenhum dos tumores PD-L1-negativos demonstraram respostas objetivas ( $p = 0,006$ ) (71). Estudos subsequentes corroboraram consistentemente a relação direta do PD-L1 com respostas globais objetivas; estudos mais maduros lograram, inclusive, demonstrar aumento de sobrevidas global e livre de progressão ao compararem populações com positividade para a expressão do PD-L1 *versus* subgrupos negativos (34,64,72). Não obstante, diversos estudos que estratificaram os pacientes para o PD-L1 sob análise *post hoc* seguiram revelando respostas clínicas (de até 15%) insubordinadas à marcação para o PD-L1 (73).

Considerando-se todos os vieses de análise do PD-L1 como biomarcador, não há um consenso sobre a obrigatoriedade de uso. Até o encerramento desta revisão, o pembrolizumab era a única droga liberada para uso dependente do PD-L1 (*companion assay*; Dako 22C3), sendo sua aferição, portanto, mandatária. Todos os demais anticorpos são considerados *complementary assays* para suas drogas correspondentes (74).

## 1.5 CÂNCER DE COLO UTERINO

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada em mulheres, no mundo; até 2015, foram registrados ~526 000 (95% IC, 483 000 – 571 000) casos, levando a ~239 000 (95% IC, 225 000 – 252 000) óbitos. Estima-se que, globalmente, a chance de acometimento tenha sido de uma em 68 mulheres, enquanto, em países em desenvolvimento, esta chance aumente para uma em 24 mulheres (75). Significativas disparidades são observadas em incidência, prevalência e mortalidade, regional e globalmente – em parte, como resultado da disparidade no acesso à saúde (76); o câncer de colo uterino transita por um estado pré-invasivo prolongado, durante o qual sua detecção precoce pode ser realizada (77). Segundo a estimativa de incidência de câncer, no Brasil, publicada em 2018 pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), 16 370 novos casos são esperados para o biênio 2018-2019, sob risco estimado de 15,43 casos a cada 100 000 mulheres (78).

Diferentes histologias foram documentadas, sendo os carcinomas escamosos os mais frequentemente diagnosticados, seguidos pelos adenocarcinomas – ambos fundamentados por diferentes mutações oncogênicas e microambientes tumorais (79–81). Diferencia-se de outros tumores por portar fatores de risco bem estabelecidos; sugere-se, inclusive, que a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) seja a primeira “causa necessária” identificada em tumores humanos (77,82–84). Mais de 100 genótipos foram identificados e, pelo menos, 20 estão associados ao câncer de colo uterino – os subtipos 16 e 18 respondem por ~70% das detecções em lesões (82). O vírus infecta as células epiteliais basais localizadas na zona de transformação cervical – que estão em constante replicação e diferenciação –, incorporando-se ao seu DNA. O genoma do HPV é composto das proteínas de expressão gênica precoce E1-E7 e tardias L1-L2. E6 promove a degradação do p53 (frequentemente por ubiquitinação), enquanto E7 liga-se à proteína do retinoblastoma (pRb), rompendo seu complexo com o fator de transcrição E2F – ambos convergindo para replicação celular (85); podem, ainda, desregular genes envolvidos no checkpoint G2/M, resultando em segregação cromossômica aberrante e consequente instabilidade genômica (86). Ademais, E6 parece estar associado ao aumento do fator induzido por hipóxia (HIF)-1- $\alpha$ , levando ao aumento do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) – validando a antiangiogênese como estratégia terapêutica (87).

O tratamento da neoplasia cervical é dependente do seu estadió clínico, podendo abordar-se estratégias isoladas, ou em combinação, que incluam manipulações cirúrgicas, quimioterapia, radioterapia e agentes biológicos (76). Pacientes com doença avançada encontram-se sob cenário terapêutico limitado, sendo estimados sete meses para sobrevida global mediana (77).

A vacinação contra o HPV é universalmente recomendada por autoridades em saúde; espera-se que esta medida seja capaz de, efetivamente, reduzir a incidência de neoplasia cervical ao longo das próximas décadas. Neste íterim, recomenda-se que estratégias de *screening* e tratamento comprovadamente eficazes em países desenvolvidos sejam aplicadas em países com maiores incidências (75,88).

### **1.5.1 Câncer de Colo Uterino x Sistema Imune**

A neoplasia de cérvix uterina desenvolve-se como consequência direta da infecção persistente pelo HPV (82,83). O sistema imune tem importante papel no controle das infecções pelo HPV, sob alta reatividade imunogênica (89). Mulheres imunossupressas apresentam incidência aumentada de infecções pelo HPV, de lesões cervicais intraepiteliais (NICs) e, possivelmente, de evolução para neoplasias invasivas (90–92).

Sistemicamente, estudos prévios já demonstraram que leucocitose, neutrofilia e linfopenia estão associados a pior prognóstico no cenário do câncer cervical (93–96). Quanto ao leito tumoral, há evidências que relacionam neoplasias associadas ao HPV com falha de resposta HPV-específica por linfócitos T citotóxicos e auxiliares tipo 1 (Th1); ademais, infiltrados intratumorais escassos em linfócitos CD8+ e abundantes em linfócitos T regulatórios (Treg) parecem representar fator prognóstico independente para sobrevida global (92,93,105,97–104). Matsumoto et al., em 2017, publicaram a avaliação da infiltração neutrofílica intratumoral (CD66b+) em 250 pacientes tratadas com radioterapia definitiva, após uma mediana de seguimento de 60 meses; a taxa de recorrência de doença foi significativamente associada à densidade de neutrófilos infiltrados. Mostrou-se relação significativa, também, à análise de sobrevida univariada: a sobrevida global, em cinco anos, foi de 77,5% para o grupo “*TAN-low*” (baixa densidade de infiltração), 58,7% para o grupo “*TAN-med*” (infiltração moderada) e 17% para o grupo “*TAN-high*” (alta densidade); a sobrevida livre de progressão, para o mesmo período, foi estimada em 73,8%, 50,7% e 11,3%, respectivamente (106).

Conceitualmente, a imunidade anti-HPV pode ser manipulada de duas formas (77,89,107):

- a) Indução de altos títulos de anticorpos específicos e neutralizantes contra proteínas tardias;
- b) Indução de imunidade celular contra proteínas virais, mediante vacinas terapêuticas, baseadas em vetores (bacterianos, virais), peptídeos, proteínas, DNA, RNA, células tumorais e dendríticas. A vacina ADXS11-001 de vetor vivo atenuado bacteriano (*Listeria monocytogenes*) está sendo avaliada em estudo de fase I/II, em pacientes com neoplasia cervical HPV-

positiva, mediante combinação com um inibidor de PD-L1 (NCT02291055) e em monoterapia (NCT02164461).

Escassos e preliminares são os resultados de inibidores de *checkpoint* em neoplasias cervicais. Um estudo, em andamento, de fase I (NCT01711515), está avaliando o efeito do ipilimumab em pacientes com câncer de colo uterino, sob estadios clínicos IB2-IIA (desde que apenas os linfonodos para-aórticos estejam comprometidos), ou estadios IIB, IIB e IVA, após quimiorradiação (incluindo braquiterapia). Outro estudo, de fase II (NCT01693783), está avaliando segurança e eficácia do ipilimumab em pacientes sob estadio clínico IV. Resultados preliminares da coorte que incluiu carcinomas cervicais do estudo KEYNOTE-028 foram apresentados no Congresso Americano de Oncologia Clínica (ASCO) de 2016. O uso de pembrolizumab, em monoterapia, resultou em taxas de sobrevida livre de progressão, em seis meses, de 13% e de sobrevida global, no mesmo período, de 66,7%. A expressão do PD-L1  $\geq 1\%$  foi considerada como critério de inclusão (108). Na edição de 2017, foram apresentados os primeiros resultados do estudo multicoorte de fase I/II (ainda em andamento) de nivolumab (CHECKMATE-358) em pacientes com tumores metastáticos vírus-associados – colo uterino, vulva e vagina. As pacientes não foram PD-L1-selecionadas. Dentre as 24 pacientes tratadas, 19 (79,2%) portavam neoplasia cervical. À mediana de follow-up de 31 semanas, a taxa de resposta objetiva foi de 20,8% – todas as respostas registradas foram em pacientes com câncer de colo uterino e não se demonstrou relação com o *status* do PD-L1, HPV ou número de exposição a linhas terapêuticas prévias (109). Em adição aos inibidores de *checkpoint*, há resultados preliminares de outras estratégias imunoterápicas em neoplasias de colo uterino – imunoterapia não-específica com modificadores de resposta biológica, terapia linfocitária T adotiva (89).

Outrora por muito tempo considerada uma possibilidade, demonstrou-se apenas nos últimos cinco anos que a carga mutacional tumoral contribui para o reconhecimento imune do câncer e que pode determinar sua resposta às estratégias imunoterápicas (19,21,110–112). Evidências sugerem que alta carga antigênica tumoral contribui para respostas autoimunes efetivas; inclusive, carga mutacional pode ser um marcador sensível para respostas a inibidores de *checkpoint*, independentemente da expressão

imuno-histoquímica de PD-L1 (113). Estudos de mapeamento gênico estão em andamento através do *The Cancer Genome Atlas* (TGCA) e do *International Cancer Genome Consortium*, na tentativa de criar-se um catálogo de genes significativamente mutados dentre as principais neoplasias (114–116). Recentemente, como parte integrante do TGCA, análise genômica em amostras cervicais revelou diversas mutações e ampliações anteriormente desconhecidas – incluindo-se a identificação da amplificação do PD-1 e PD-L1, corroborando o racional de representarem alvos terapêuticos (117).

## 1.6 OBJETIVO

Haja vista a supracitada escassez de estudos explorando a via PD-1/PD-L1 no cenário do câncer de colo uterino, associados a comensurativos imunes, conduzimos um estudo para avaliarmos o potencial impacto que a expressão do PD-L1 em neoplasias cervicais e sua relação com infiltrados linfocitários peritumorais possam exercer em desfechos de sobrevida.

Objetivo primário: relacionar a expressão do PD-L1 com desfechos de sobrevida em neoplasias cervicais.

Objetivos secundários:

- a) Relacionar infiltrados linfocitários peritumorais em neoplasias cervicais com desfechos de sobrevida e expressão do PD-L1;
- b) Avaliar a expressão do FoxP3 como biomarcador em espécimes cervicais e respectivos infiltrados linfocitários peritumorais.

## 2 REFERÊNCIAS

1. Ai M, Curran MA. Immune checkpoint combinations from mouse to man. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Jul 3;64(7):885–92.
2. Spitzer MH, Carmi Y, Reticcker-Flynn NE, Kwek SS, Madhireddy D, Martins MM, et al. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017 Jan;168(3):487–502.e15.
3. Burnet M. Cancer-a Biological Approach Iii. Viruses Associated With Neoplastic Conditions. *Br Med J*. 1957 Apr 13;1(5023):841–7.
4. Thomas L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. Lawrence HS, editor. New York: Hoeber-Harper; 1959. 529-532 p.
5. Klein G. Tumor Antigens. *Annu Rev Microbiol*. 1966 Oct;20(1):223–52.
6. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991–8.
7. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004 Apr 19;22(1):329–60.
8. Dhupar R, Van Der Kraak L, Pennathur A, Schuchert MJ, Nason KS, Luketich JD, et al. Targeting Immune Checkpoints in Esophageal Cancer: A High Mutational Load Tumor. *Ann Thorac Surg*. 2017 Apr;103(4):1340–9.
9. Boshoff C, Weiss R. Aids-related malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2002 May 1;2(5):373–82.
10. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer*. 1991 Aug 19;49(1):44–9.
11. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer*. 1992;29A(1):69–75.

12. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Aug 15;58(16):3491–4.
13. Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, Franklin RA, Luo CT, Oh SA, et al. Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell.* 2016;164(3):365–77.
14. Finn OJ. *Cancer Immunology.* *N Engl J Med.* 2008 Jun 19;358(25):2704–15.
15. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80- ).* 2011 Mar 25;331(6024):1565–70.
16. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MWL. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Nov 24;13(3):143–58.
17. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science (80- ).* 2015 Apr 3;348(6230):56–61.
18. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular Constituents of Immune Escape within the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 2012;72(13).
19. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017 Jan 19;541(7637):321–30.
20. Hanahan D, Weinberg RA, Pan KH, Shay JW, Cohen SN, Taylor MB, et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
21. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1–10.
22. Ribas A. Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2517–9.
23. Pinzon-Charry A, Maxwell T, López JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a

- mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol.* 2005 Oct;83(5):451–61.
24. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès–Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Jul 25;
  25. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 22;12(4):252–64.
  26. Weber JS, O’Day S, Urba W, Powderly J, Nichol G, Yellin M, et al. Phase I/II Study of Ipilimumab for Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 20;26(36):5950–6.
  27. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother.* 2007;30(8):825–30.
  28. Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, Kamat A, Ng Tang DS, Sun J, et al. Preoperative CTLA-4 Blockade: Tolerability and Immune Monitoring in the Setting of a Presurgical Clinical Trial. *Clin Cancer Res.* 2010 May 15;16(10):2861–71.
  29. Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden M V, Haluska FG, Kruse A, et al. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 26;105(8):3005–10.
  30. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2011 Jun 30;364(26):2517–26.
  31. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016 Nov 10;375(19):1823–33.
  32. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced

- non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016 Apr 9;387(10027):1540–50.
33. Langer CJ, Gadgeel SM, Borghaei H, Papadimitrakopoulou VA, Patnaik A, Powell SF, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *Lancet Oncol*. 2016 Nov;17(11):1497–508.
  34. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Oct 22;373(17):1627–39.
  35. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017 Sep 8;NEJMoa1709937.
  36. Bajorin DF, Plimack ER, Siefker-Radtke AO, Choueiri TK, De Wit R, Sonpavde G, et al. KEYNOTE-052: Phase 2 study of pembrolizumab (MK-3475) as first-line therapy for patients (pts) with unresectable or metastatic urothelial cancer ineligible for cisplatin-based therapy. *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33(15\_suppl):TPS4572-TPS4572.
  37. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee J-L, Fong L, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2017 Mar;376(11):1015–26.
  38. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Mar;18(3):312–22.
  39. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar A V, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-

- based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* (London, England). 2016 May 7;387(10031):1909–20.
40. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1803–13.
  41. Seiwert TY, Burtneess B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):956–65.
  42. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1856–67.
  43. Diaz LA, Marabelle A, Delord J-P, Shapira-Frommer R, Geva R, Peled N, et al. Pembrolizumab therapy for microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer (CRC) and non-CRC. *J Clin Oncol*. 2017 May 20;35(15\_suppl):3071.
  44. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):1182–91.
  45. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jul 2;373(1):23–34.
  46. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann Oncol*. 2016 Aug 1;27(8):1492–504.
  47. Mandal R, Chan TA. Personalized Oncology Meets Immunology: The Path toward Precision Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2016 Jul 1;6(7):703–13.
  48. Topalian SL, MD H, A S, DM P. Targeting Immune Checkpoints in Cancer

Therapy. *JAMA*. 2017 Sep 8;348(6230):124–8.

49. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008 Apr;26(1):677–704.
50. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027–34.
51. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science* (80- ). 2001 Jan 12;291(5502):319–22.
52. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelakanou V, Rehman J, et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;2(1):1–9.
53. Mansfield AS, Murphy SJ, Peikert T, Yi ES, Vasmatazis G, Wigle DA, et al. Heterogeneity of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Multifocal Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(9).
54. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, et al. PD-L1/B7H-1 Inhibits the Effector Phase of Tumor Rejection by T Cell Receptor (TCR) Transgenic CD8  $\gamma$  T Cells. *CANCER Res*. 2004;64:1140–5.
55. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol*. 2004 Dec 20;17(2):133–44.
56. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Sep 17;99(19):12293–7.
57. Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer*. 2015 Apr 28;112(9):1421–7.

58. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jun 1;8(6):467–77.
59. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Vol. 69, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2001. p. 89–95.
60. Ballman K V. Biomarker: Predictive or Prognostic? *J Clin Oncol*. 2015 Nov 20;33(33):3968–71.
61. Mahoney KM, Atkins MB. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology (Williston Park)*. 2014 Nov;28 Suppl 3:39–48.
62. Group F-NBW. Understanding Prognostic versus Predictive Biomarkers. 2016 Dec 22;
63. Oldenhuis CNAM, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EGE, Mazumdar M, Thorburn A. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*. 2008 May 1;44(7):946–53.
64. Kerr KM, Hirsch FR. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe? *Arch Pathol Lab Med*. 2016 Apr;140(4):326–31.
65. Liu D, Wang S, Bindeman W. Clinical applications of PD-L1 bioassays for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2017 Dec 17;10(1):110.
66. Scheerens H, Malong A, Bassett K, Boyd Z, Gupta V, Harris J, et al. Current Status of Companion and Complementary Diagnostics: Strategic Considerations for Development and Launch. *Clin Transl Sci*. 2017 Mar 1;10(2):84–92.
67. Lopes G, Parker JL, Willan A, Shah S, Weerasinghe A, Rubinger D, et al. The role of biomarkers in improving clinical trial success: A study of 1,079 oncology drugs. *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33(15\_suppl):e17804–e17804.
68. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol*.

2017 Jun 27;

69. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016 Dec;17(12):e542–51.
70. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, 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. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 1;28(19):3167–75.
71. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
72. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2018–28.
73. Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2015 Aug;23:32–8.
74. Diggs LP, Hsueh EC. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomark Res*. 2017;5:12.
75. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):524.
76. Chuang LT, Temin S, Camacho R, Dueñas-Gonzalez A, Feldman S, Gultekin M, et al. Management and Care of Women With Invasive Cervical Cancer: American Society of Clinical Oncology Resource-Stratified Clinical Practice Guideline. *J Glob Oncol*. 2016 Oct 23;2(5):311–40.
77. Tewari KS, Monk BJ. Invasive cervical cancer. In: DiSaia PJ, Creasman W, editors. *Clinical gynecologic oncology*. 8th ed. Philadelphia: Mosby; 2012.

78. Brazil IN de CJAG da Si. ESTIMATIVA | 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. 2015;60(1):1–126.
79. de Freitas AC, Gurgel APAD, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CMM. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecol Oncol.* 2012 Aug;126(2):304–11.
80. Wright AA, Howitt BE, Myers AP, Dahlberg SE, Palescandolo E, Van Hummelen P, et al. Oncogenic mutations in cervical cancer. *Cancer.* 2013 Nov 1;119(21):3776–83.
81. Heeren AM, Punt S, Bleeker MC, Gaarenstroom KN, van der Velden J, Kenter GG, et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol.* 2016 Jul 8;29(7):753–63.
82. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr;55(4):244–65.
83. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May 1;2(5):342–50.
84. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun;80(12):3812–5.
85. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1505–11.
86. Patel D, Incassati A, Wang N, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cause polyploidy in human keratinocytes and up-regulation of G2-M-phase proteins. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1299–306.
87. Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific

- stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology*. 2009 May 10;387(2):442–8.
88. Tsu V, Jerónimo J. Saving the World's Women from Cervical Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Jun 30;374(26):2509–11.
  89. Menderes G, Black J, Schwab CL, Santin AD. Immunotherapy and targeted therapy for cervical cancer: an update. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016 Jan 2;16(1):83–98.
  90. Senba M, Mori N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncol Rev*. 2012 Oct 2;6(2):e17.
  91. Tindle RW. OPINION Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan 1;2(1):59–64.
  92. Seresini S, Origoni M, Lillo F, Caputo L, Paganoni AM, Vantini S, et al. IFN- $\gamma$  Produced by Human Papilloma Virus-18 E6-Specific CD4+ T Cells Predicts the Clinical Outcome after Surgery in Patients with High-Grade Cervical Lesions. *J Immunol*. 2007;179(10).
  93. Mabuchi S, Matsumoto Y, Kawano M, Minami K, Seo Y, Sasano T, et al. Uterine cervical cancer displaying tumor-related leukocytosis: A distinct clinical entity with radioresistant feature. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Jun 19;106(7):dju147-dju147.
  94. Mabuchi S, Matsumoto Y, Isohashi F, Yoshioka Y, Ohashi H, Morii E, et al. Pretreatment leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2011 Jul;122(1):25–32.
  95. Onal C, Guler OC, Yildirim BA. Prognostic Use of Pretreatment Hematologic Parameters in Patients Receiving Definitive Chemoradiotherapy for Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2016 Jul;26(6):1169–75.
  96. Tavares-Murta BM, Mendonça MAO, Duarte NL, da Silva JA, Mutão TS, Garcia CB, et al. Systemic Leukocyte Alterations Are Associated With Invasive Uterine

Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Oct;20(7):1154–9.

97. Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Bossini B, Roman JJ, Cannon MJ, et al. Induction of tumor-specific cytotoxicity in tumor infiltrating lymphocytes by HPV16 and HPV18 E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2003 May;89(2):271–80.
98. Hilders CG, Ras L, van Eendenburg JD, Nooyen Y, Fleuren GJ. Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J cancer*. 1994 Jun 15;57(6):805–13.
99. Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*. 1997 Jul 15;57(14):2943–50.
100. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, van den Muysenberg AJ, Gunther AW, Scheper RJ, et al. Assessment of cytotoxic T-lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA-1 in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer*. 1997;76(10):1353–60.
101. Hilders CGJM, Munoz IM, Nooyen Y, Fleuren GJ. Altered HLA Expression by Metastatic Cervical Carcinoma Cells as a Factor in Impaired Immune Surveillance. *Gynecol Oncol*. 1995 Jun;57(3):366–75.
102. Bethwaite PB, Holloway LJ, Thornton A, Delahunt B. Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology*. 1996 Nov;28(4):321–7.
103. Hilders CG, Houbiers JG, van Ravenswaay Claasen HH, Veldhuizen RW, Fleuren GJ. Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma. *Lab Invest*. 1993 Dec;69(6):651–9.
104. Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, Prins F, Durrant LG, Kenter GG, et al. Human Leukocyte Antigen Class I, MHC Class I Chain-Related Molecule A, and CD8+/Regulatory T-Cell Ratio: Which Variable Determines Survival of Cervical

Cancer Patients? Clin Cancer Res. 2008 Apr 1;14(7):2028–35.

105. Carus A, Ladekarl M, Hager H, Nedergaard BS, Donskov F. Tumour-associated CD66b+ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. Br J Cancer. 2013 May 28;108(10):2116–22.
106. Matsumoto Y, Mabuchi S, Kozasa K, Kuroda H, Sasano T, Yokoi E, et al. The significance of tumor-associated neutrophil density in uterine cervical cancer treated with definitive radiotherapy. Gynecol Oncol. 2017 Jun;145(3):469–75.
107. Diaz-Padilla I, Monk BJ, Mackay HJ, Oaknin A. Treatment of metastatic cervical cancer: Future directions involving targeted agents. Crit Rev Oncol / Hematol. 2013;85:303–14.
108. Frenel J-S, Le Tourneau C, O’Neil BH, Ott PA, Piha-Paul SA, Gomez-Roca CA, et al. Pembrolizumab in patients with advanced cervical squamous cell cancer: Preliminary results from the phase Ib KEYNOTE-028 study. J Clin Oncol. 2016 May 20;34(15\_suppl):5515.
109. Hollebecque A, Meyer T, Moore KN, Machiels J-PH, De Greve J, López-Picazo JM, et al. An open-label, multicohort, phase I/II study of nivolumab in patients with virus-associated tumors (CheckMate 358): Efficacy and safety in recurrent or metastatic (R/M) cervical, vaginal, and vulvar cancers. J Clin Oncol. 2017 May 20;35(15\_suppl):5504.
110. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy— Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1.
111. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. Annu Rev Immunol. 2013 Mar 21;31(1):51–72.
112. Brea EJ, Oh CY, Manchado E, Budhu S, Gejman RS, Mo G, et al. Kinase Regulation of Human MHC Class I Molecule Expression on Cancer Cells. Cancer Immunol Res. 2016;4(11).

113. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8).
114. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G V, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013 Jul 11;499(7457):214–8.
115. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacoen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1–2):48–61.
116. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science (80- ).* 2015;349(6255).
117. Burki TK. Novel mutations in cervical cancer. *Lancet Oncol.* 2017 Mar;18(3):e137.
118. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010 Feb 25;29(8):1093–102.
119. Galon J, Fridman W-H, Pagès F. The Adaptive Immunologic Microenvironment in Colorectal Cancer: A Novel Perspective. *Cancer Res.* 2007;67(5).
120. Enwere EK, Kornaga EN, Dean M, Koulis TA, Phan T, Kalantarian M, et al. Expression of PD-L1 and presence of CD8-positive T cells in pre-treatment specimens of locally advanced cervical cancer. *Mod Pathol.* 2017 Apr 6;30(4):577–86.
121. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):793–800.
122. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, et al. Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type. *Cancer Epidemiol Prev Biomarkers.*

2014;23(12).

123. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4).
124. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J, Wang W. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. Soutto M, editor. *PLoS One.* 2015 Jun 26;10(6):e0131403.
125. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 2017 Jan 20;27(1):109–18.
126. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015 Dec 14;5(1):15179.
127. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. Vol. 9, *OncoTargets and Therapy.* Dove Press; 2016. p. 5023–39.
128. Karim R, Jordanova ES, Piersma SJ, Kenter GG, Chen L, Boer JM, et al. Tumor-Expressed B7-H1 and B7-DC in Relation to PD-1+ T-Cell Infiltration and Survival of Patients with Cervical Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20).

### 3 ARTIGO

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é a segunda neoplasia mais frequentemente diagnosticada em mulheres, no mundo; até 2015, foram registrados ~526 000 (95% IC, 483 000-571 000) casos, levando a ~239 000 (95% IC, 225 000-252 000) óbitos. Estima-se que, globalmente, o acometimento seja de uma em 68 mulheres, enquanto, em países em desenvolvimento, esta probabilidade aumente para uma em 24 mulheres (75). Significativas disparidades são observadas em incidência, prevalência e mortalidade, regional e globalmente – em parte, como resultado da disparidade no acesso à saúde (76); o câncer de colo uterino transita por um estado pré-invasivo prolongado, durante o qual sua detecção precoce pode ser realizada (77). Segundo a estimativa de incidência de câncer, no Brasil, publicada em 2018 pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), 16 370 novos casos são esperados para o biênio 2018-2019, sob risco estimado de 15,43 casos a cada 100 000 mulheres (78).

Diferentes histologias foram documentadas, sendo os carcinomas escamosos os mais frequentemente diagnosticados, seguidos pelos adenocarcinomas – ambos fundamentados por diferentes mutações oncogênicas e microambientes tumorais (79–81). Sugere-se, inclusive, que a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) seja a primeira “causa necessária” identificada em tumores humanos (77,82–84). O sistema imune exerce importante papel no controle das infecções pelo HPV, sob alta reatividade imunogênica (89). Mulheres imunossupressas apresentam incidência aumentada de infecções pelo HPV, de lesões cervicais intraepiteliais (NICs) e, possivelmente, de evolução para neoplasias invasivas (90–92). A identificação de populações inflamatórias intratumorais em séries retrospectivas (14,118) motivou o desenvolvimento de modelos analíticos envolvendo a distribuição espacial, densidade e orientação funcional das diferentes populações celulares imunes em relação ao microambiente tumoral – o “contexto imune” (24,119) –, em busca de um biomarcador preditor de *endpoints* oncológicos. O eixo PD-1/PD-L1 é, atualmente, o *checkpoint* imune mais explorado como alternativa terapêutica antineoplásica; não obstante, poucas informações sobre sua expressão estão disponíveis para o câncer de colo

uterino (120). Desde que análises iniciais em neoplasias de pulmão, ovário, rim e melanomas evidenciaram altos níveis de expressão de PD-L1 (25,121), estudos subsequentes sugeriram que seu *status* – independente de estratégias terapêuticas – pode estar relacionado a prognósticos oncológicos (25,58,74,122,123). Devido à heterogeneidade de resultados, o maior arsenal científico é oriundo uma meta-análise conduzida por Wu et al. (2015) com 28 estudos (3 107 pacientes) para avaliar o potencial valor prognóstico do PD-L1 em tumores sólidos. Observou-se detrimento da sobrevida global, em três anos, em tumores esofágicos, gástricos, carcinomas hepatocelulares e uroteliais, não sendo demonstrada associação em melanomas, cânceres de pulmão e orofaringe; resultados semelhantes foram observados em cinco anos, com adição da ausência de impacto em sobrevida no único manuscrito que incluiu pacientes com câncer de colo uterino (124). Recentemente, a infiltração tumoral de linfócitos Treg – marcados pela expressão de FoxP3 –, passou a ser avaliada como potencial biomarcador imune; não obstante, resultados discrepantes tem sido reportados (125,126).

Neste estudo, avaliamos o potencial impacto que a expressão do PD-L1 em neoplasias cervicais e sua relação com infiltrados linfocitários peritumorais possam exercer em desfechos de sobrevida.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Pacientes

Foram avaliados, retrospectivamente, todos os casos de neoplasia de cérvix uterina registrados entre 01 de janeiro de 2012 e 31 de dezembro de 2016. Foram inicialmente incluídas todas as pacientes tratadas pela instituição. Blocos de parafina com biópsias externas foram permitidos, já que todos os diagnósticos seriam submetidos à reconfirmação diagnóstica e revisão para suficiência e qualidade do material histológico.

Dados clínico-patológicos foram coletados e analisados pelos pesquisadores a partir de prontuários eletrônicos. Foram analisadas as variáveis idade ao diagnóstico (anos), história prévia de tabagismo, *Performance Status* (PS) ao diagnóstico, subtipo

histológico, estadiamento clínico (EC, baseado no sistema FIGO – Federação internacional de Ginecologia e Obstetrícia, 2009), data do diagnóstico, modalidade de tratamento realizado (cirurgia, quimiorradioterapia, radioterapia exclusiva, braquiterapia), data da progressão de doença (quando pertinente), data do óbito (quando pertinente) e data do último *follow-up*.

Foram previamente definidas:

- a) Data do diagnóstico: data da obtenção do material histológico cervical;
- b) Sobrevida livre de progressão: tempo entre a data do diagnóstico até a data da progressão de doença e/ou data do último *follow-up*;
- c) Sobrevida global: tempo entre a data do diagnóstico até a data do registro de óbito e/ou data do último *follow-up*.

Foram adotados como critérios de exclusão a insuficiência ou discrepância de dados, além da indisponibilidade de material histológico.

### **3.2.2 Imunohistoquímica**

As lâminas originais de neoplasias cervicais, coradas em hematoxilina e eosina, foram independentemente revisadas por três patologistas para confirmação diagnóstica.

A expressão do PD-L1 (RTB-PDL1, Bio SB®) e de FoxP3 (EP340, Cell Marque®) foi avaliada por imuno-histoquímica. Foram realizados cortes seriados dos blocos de parafina com espessura de 3 µm e submetidas as lâminas à recuperação antigênica utilizando calor (98° C) em solução de EDTA durante 15 minutos, lavando-se com água destilada em seguida. Utilizou-se peroxidase como solução tampão por 5 minutos. Os anticorpos foram pipetados (ambos sob diluição 1:100) e deixados sobre as lâminas por 60 minutos. Posteriormente, adicionou-se o substrato cromógeno DAB e foi realizada a contra-coloração com hematoxilina. Casos discordantes foram revisados e obteve-se consenso na gradação de todos os casos. A imunorreatividade do PD-L1 foi avaliada à marcação na membrana celular das células tumorais. Um caso foi considerado PD-L1-positivo mediante qualquer imunorreatividade, sob qualquer intensidade, com padrão de marcação em membrana celular; quaisquer outras marcações, incluindo nuclear, citoplasmática e extracelular foram desconsideradas, evitando-se falsos-positivos. Quanto ao FoxP3, considerou-se marcação positiva qualquer imunorreatividade

nuclear, sob qualquer intensidade; outros padrões de marcação foram desconsiderados.

Os linfócitos intratumorais foram quantificados e qualificados sob as categorias fraco, moderado e intenso; sua marcação para o PD-L1 e para FoxP3 foi avaliada lançando-se mão dos critérios supradescritos.

### **3.2.3 Aspectos Éticos**

Não dispomos de conflitos de interesse a serem declarados. Todo o custeio de pesquisa foi financiado pelos próprios pesquisadores, em adição ao autor principal ter sido contemplado pela bolsa de pós-graduação CAPES/FAPERGS durante o ano de 2018.

Todos os pesquisadores assinaram o termo de sigilo e confidencialidade, após devida aprovação pelo Conselho Científico e Editorial do Hospital Geral e pelo designado Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Em se tratando de um estudo de biomarcador, foram seguidos os *guidelines* REMARK do *NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics*, considerados padrão-ouro para guiarem publicações neste campo.

### **3.2.4 Aspectos Estatísticos**

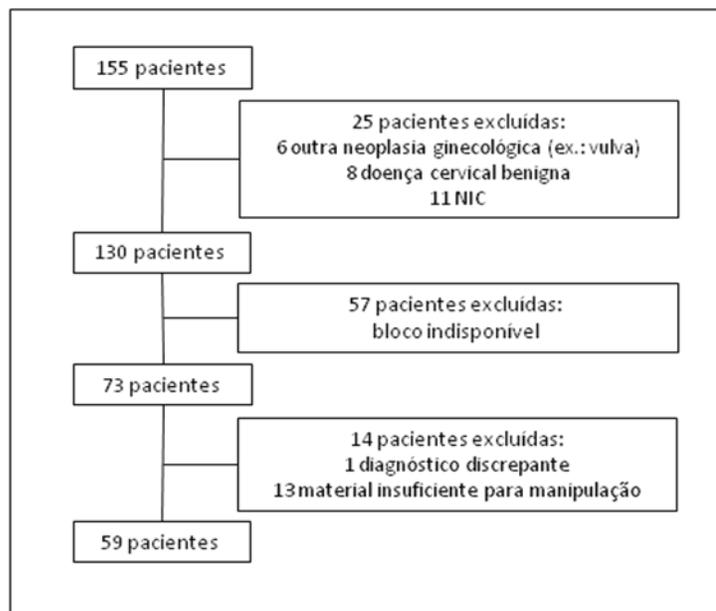
Frequências absoluta e relativa foram utilizadas para análise estatística descritiva das variáveis. Os testes exato de Fisher e  $\chi^2$  bicaudal foram utilizados quando apropriados. Taxas de sobrevivência foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e analisadas pelo teste de log-rank. Modelos proporcionais univariados de Cox foram aplicados para determinação do *hazard ratio* (HR) representante dos riscos de morte ou progressão entre os diferentes grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do *Statistical Package for the Social Sciences Software Package* (SPSS) versão 22.0.

## **3.3 RESULTADOS**

### **3.3.1 Pacientes**

Um total de 155 pacientes foi inicialmente incluído. Foram excluídas 25 pacientes por discrepância diagnóstica, enquanto 57 pacientes não dispunham de material histológico disponível na Unidade de Patologia. Após a confirmação diagnóstica histopatológica, 13 pacientes foram excluídas por insuficiência de material tecnicamente adequado para análise e um caso foi excluído por inconformidade diagnóstica. O diagrama de fluxo da coorte em estudo encontra-se na Figura 1.

Figura 1  
Fluxograma de recrutamento da coorte.



A mediana de idade observada foi de 44 anos, 28,8% apresentou história de tabagismo. Carcinoma escamoso foi o tipo histológico preponderantemente diagnosticado – 86,4% (n = 51) dos casos, seguido pelo adenocarcinoma (n = 8). Ao diagnóstico, 28,8% (n = 17) portava PS 0, enquanto 62,7% (n = 32) portava PS 1; três pacientes apresentavam PS 2, e duas pacientes, PS 3. Seis (10,1%) pacientes encontravam-se em EC I, 18 (30,5%) em EC II, 24 (40,7%) pacientes em EC III, oito (13,6%) pacientes em EC IVA e três (5,1%), em EC IVB.

Cirurgia *frontline* foi oferecida a 27,1% das pacientes (n = 16), enquanto 64% (n = 38) receberam quimiorradiação como tratamento definitivo; 19 (32,2%) pacientes foram submetidas à braquiterapia complementar. Nove pacientes (16%) receberam radioterapia exclusiva.

A mediana de seguimento foi de 26,2 meses. Progressão de doença foi objetivamente documentada em 47,5% (n = 28) dos casos. Vinte (33,9%) óbitos ocorreram durante o período de seguimento desta coorte.

### **3.3.2 Avaliação Tumoral Cervical**

À avaliação das variáveis clínico-patológicas (idade, tabagismo, PS, subtipo histológico, EC, modalidade de tratamento realizado e desfecho de resposta), nenhuma exerceu, isoladamente, impacto sobre a variabilidade de expressão do PD-L1 dentre os espécimes neoplásicos estudados.

Observou marcação para o PD-L1 em 32,2% (n = 19) das amostras cervicais (Figura 2); dentre estas, cinco (8,5%) apresentaram expressão de PD-L1 superior a 50%. A mediana de sobrevida global para o grupo PD-L1-negativo é de 47,8 meses, não tendo ainda sido atingida para o grupo PD-L1-positivo (p = 0,968; Figura 3).

Figura 2

Marcação imuno-histoquímica para o PD-L1, sob positividade mediante marcação de membrana. Aumento de 400x. Neoplasia cervical escamosa PD-L1-positiva,

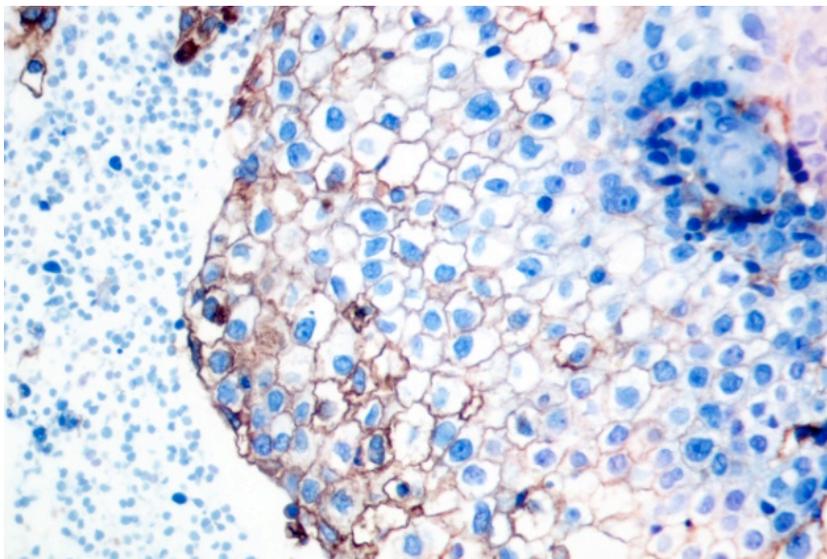
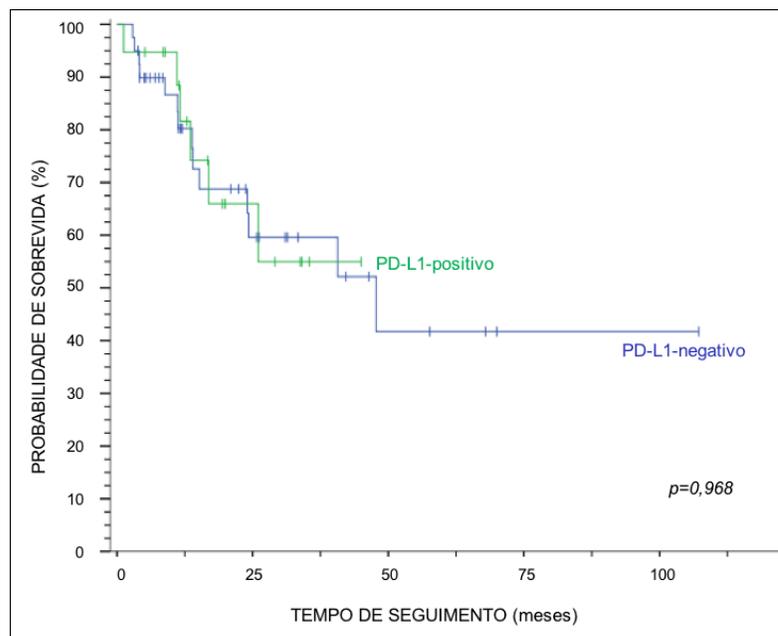


Figura 3

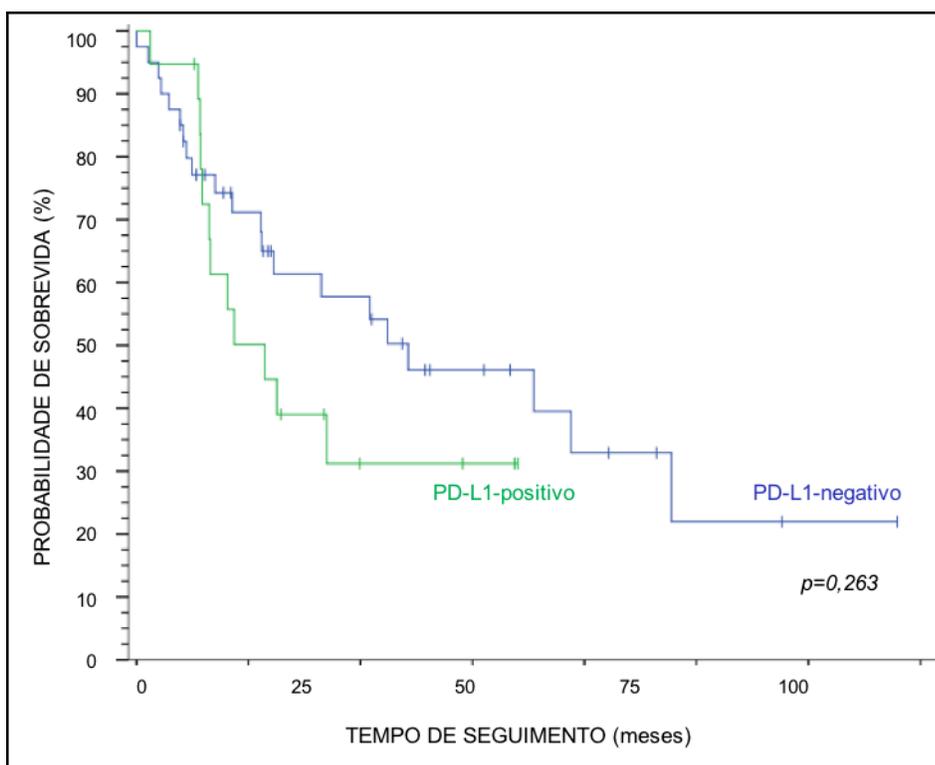
Curvas de Kaplan-Meier e teste de log-rank oriundos da análise de sobrevida global de pacientes com neoplasia cervical, baseada na expressão do PD-L1.



A mediana de sobrevida livre de progressão foi de 24,3 meses para o grupo PD-L1-negativo e 11,5 meses para o grupo PD-L1-positivo ( $p = 0,263$ ; Figura 4).

Figura 4

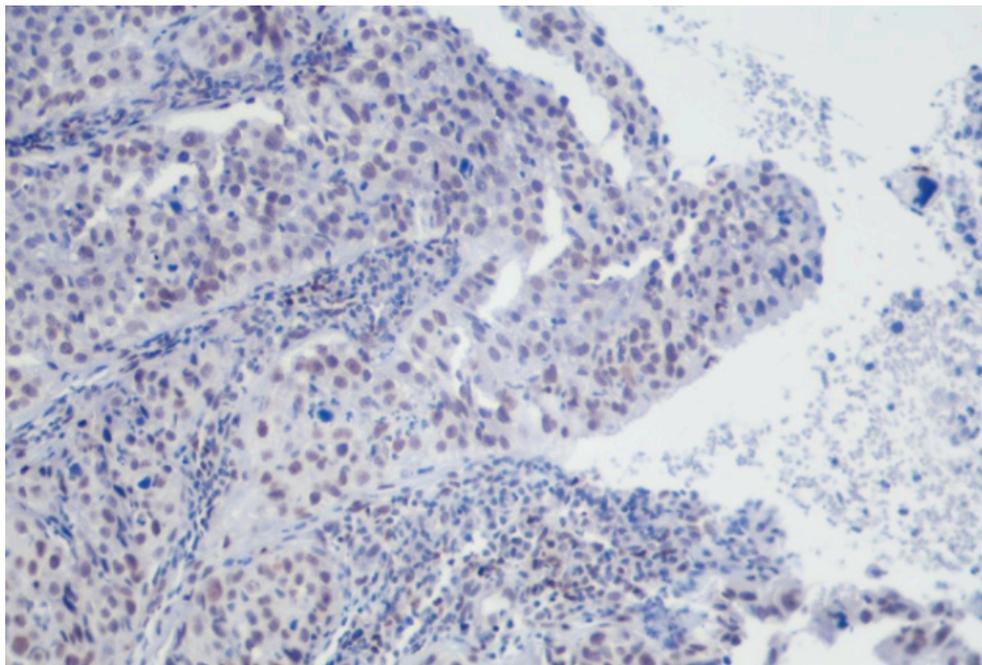
Curvas de Kaplan-Meier e teste de log-rank oriundos da análise de sobrevida livre de progressão de pacientes com neoplasia cervical, baseada na expressão do PD-L1.



À imuno-histoquímica para o FoxP3, 64,4% ( $n = 38$ ) dos espécimes tumorais tornaram-se imunorreativos (Figura 5); entretanto, sua expressão não exerceu impacto em desfechos de sobrevida (dados não aqui demonstrados). À análise da relação PD-L1/FoxP3, 57,9% ( $n = 11$ ) dos tumores PD-L1-positivos demonstraram positividade para o FoxP3 *versus* 67,5% ( $n = 27$ ) dentre os espécimes PD-L1-negativos ( $p = 0,56$ ).

Figura 5

Marcação imuno-histoquímica para o FoxP3, sob positividade mediante marcação nuclear. Aumento de 400x. Neoplasia cervical escamosa FoxP3-positiva.

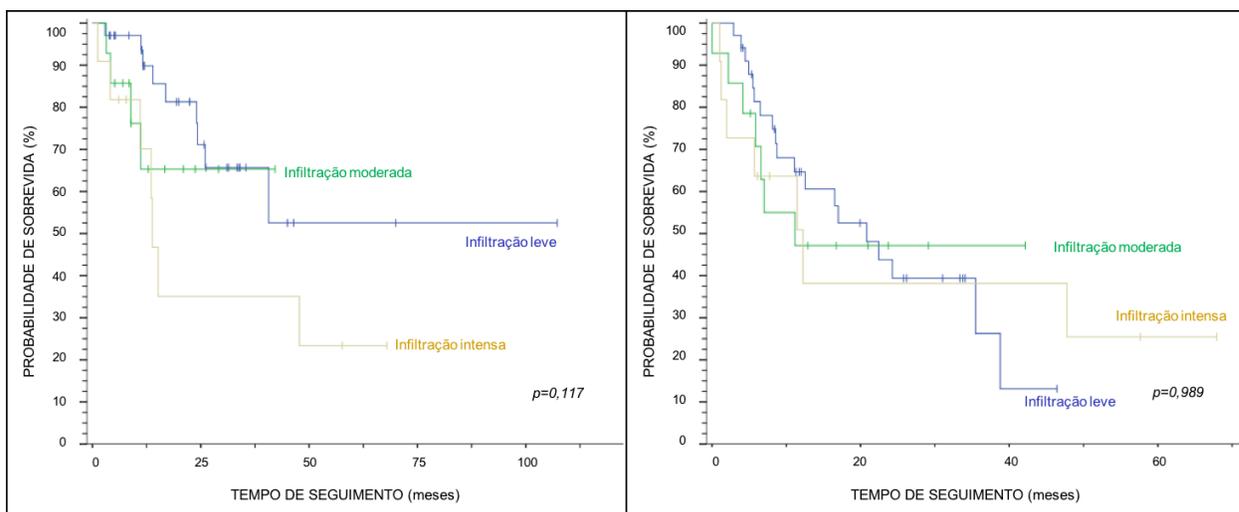


### 3.3.3 Infiltrados Linfocitários Peritumorais

Infiltrado linfocitário peritumoral leve foi observado em 57,6% (n = 34) das amostras, moderado em 23,7% (n = 14) e intenso em 18,6% (n = 11) das amostras. A estratificação por volume de infiltrado linfocitário não exerceu impacto significativo em desfechos de sobrevida (Figura 6).

Figura 6

Curvas de Kaplan-Meier e teste de log-rank oriundos da análise de sobrevida global (esquerda) e sobrevida livre de progressão (direita) de pacientes com neoplasia cervical, baseada na quantificação de infiltração linfocitária peritumoral.



Marcação para o PD-L1 foi observada em 27,1% (n=16) dos infiltrados linfocitários (Figura 7) e, à análise de sobrevida, não houve diferença entre os marcadores e não-marcadores. Demonstraram-se positivos para o FoxP3 93,2% (n = 55) dos infiltrados linfocitários (Figura 8), sem exercer impacto em desfechos de sobrevida (dados não aqui demonstrados). 94,7% dos tumores PD-L1-positivos expressaram marcação positiva para o FoxP3 em seus respectivos infiltrados peritumorais *versus* 92,5% (n = 40) dentre os infiltrados associados às neoplasias cervicais PD-L1-negativas (p > 0,99).

Figura 7

Marcação imuno-histoquímica para o PD-L1, sob positividade mediante marcação de membrana. Aumento de 400x. Infiltrado inflamatório peritumoral PD-L1-positivo.

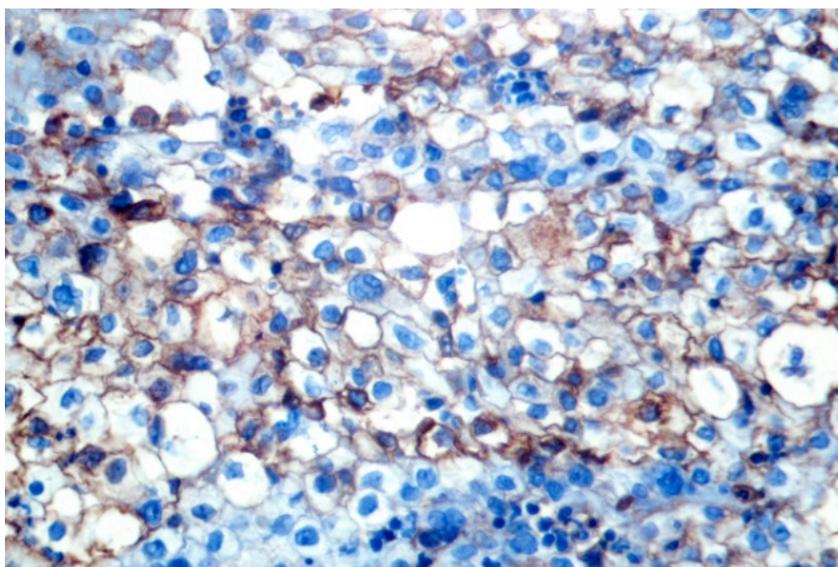
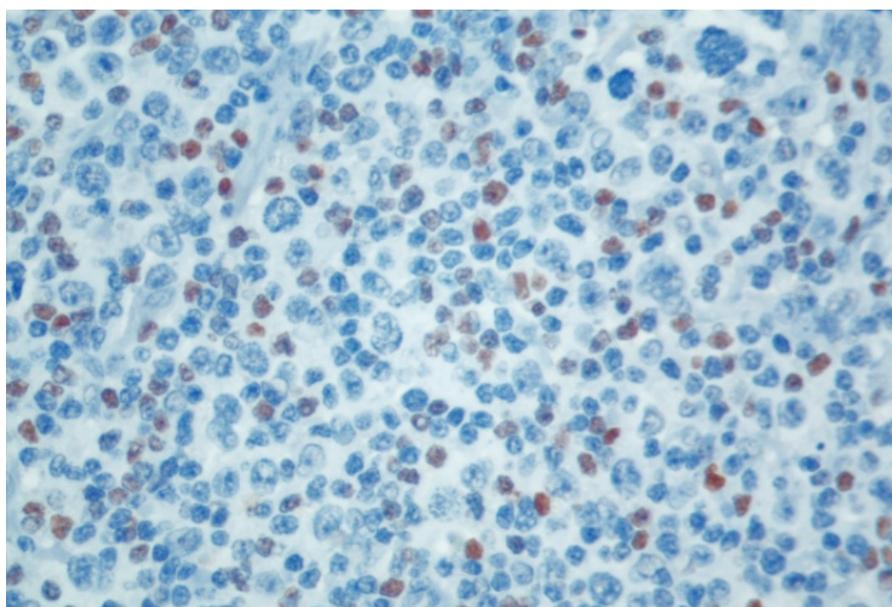


Figura 8

Marcação imuno-histoquímica para o FoxP3, sob positividade mediante marcação nuclear. Aumento de 400x. Infiltrado inflamatório peritumoral FoxP3-positivo.



## 3.4 DISCUSSÃO

### 3.4.1 Avaliação Tumoral Cervical

Sob resultados discordantes, a expressão do PD-L1 já foi previamente associada a desfechos positivos, negativos e desfechos não-PD-L1-associados neste cenário. Wang et al. reportaram, inicialmente, que a expressão isolada do PD-L1 em neoplasias cervicais (bem como em carcinomas tímicos e carcinomas espinocelulares de pulmão) não parece ser capaz de prever desfechos; entretanto, parece portar significado preditor quando combinada a outros indicadores, como a proporção linfocitária T CD8+/CD4+CD25+FoxP3+ (127).

Heeren et al. avaliaram o efeito prognóstico entre os diferentes padrões de expressão do PD-L1 em duas coortes de carcinomas escamosos e adenocarcinomas – 156 e 49 na primeira coorte e 96 e 31, na segunda, respectivamente. As amostras foram obtidas entre 1985 e 2008. O ponto de corte utilizado para positividade do PD-L1 foi  $\geq 5\%$ ; foi diferentemente observado entre carcinomas escamosos (54%) e adenocarcinomas (14%;  $p < 0,001$ ), bem como entre subtipos de HPV – 83% HPV-18 *versus* 42% HPV-16 ( $p < 0,001$ ). Sob resultados conflitantes, pacientes com neoplasias escamosas evoluíram com pior sobrevida livre de progressão mediante expressão difusa ( $p = 0,046$ ) ou ausente ( $p = 0,029$ ) do PD-L1, em comparação com expressão marginal do PD-L1 (81).

Em 2017, Enwere et al. publicaram os resultados da determinação de expressão do PD-L1 tumoral em 120 pacientes com câncer de colo uterino localmente avançado, tratadas com quimiorradiação radical; a expressão em células imunes foi desconsiderada. Inicialmente, seus dados de prevalência de expressão do PD-L1 chamam a atenção: 87,9% das suas amostras foram consideradas positivas quando levado em consideração ponto de corte de  $\geq 1\%$ ; 95,7%, mediante *cut-off* de  $>0\%$ , 73,3% se  $\geq 5\%$ , 66,4%, se  $\geq 10\%$ , 56%, se  $\geq 25\%$  e 39,7%, se  $\geq 50\%$  (120). Se considerado ponto de corte  $\geq 50\%$ , houve marcação para o PD-L1 em apenas 8,5% das nossas amostras. Não houve associação entre a expressão do PD-L1 e características clínico-patológicas – idade, estadió clínico, tamanho do tumor, *status* linfonodal. Semelhantemente, as variáveis clínico-patológicas avaliadas por nosso estudo não

exerceram impacto em prognóstico ou expressão do PD-L1. Em concordância com nossos resultados, seu estudo também falhou em observar associação entre sobrevidas global e livre de progressão e a expressão tumoral deste biomarcador.

A interpretação dos nossos resultados deve ser realizada com cautela, considerando-se a amostra limitada. Outrora as medianas de sobrevida livre de progressão sejam numericamente discrepantes – 24,3 meses para o grupo PD-L1-negativo e 11,5 meses para o grupo PD-L1-positivo – não se encontrou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,263$ ). Contudo, é passível de consideração que, em conjunto, as observações supraexpostas corroborem que a expressão do PD-L1, em neoplasias cervicais, não exerça impacto em sobrevida.

#### **3.4.2 Infiltrados Linfocitários Peritumorais**

Quanto ao leito tumoral, há evidências que relacionam neoplasias associadas ao HPV com falha de resposta HPV-específica por linfócitos T citotóxicos e auxiliares tipo 1 (Th1); ademais, infiltrados intratumorais escassos em linfócitos CD8+ e abundantes em linfócitos T regulatórios (Treg) parecem representar fator prognóstico independente para sobrevida global (92,93,105,97–104).

Em 2017, Matsumoto et al. publicaram a avaliação da infiltração neutrofílica intratumoral (CD66b+) em 250 pacientes tratadas com radioterapia definitiva, após uma mediana de seguimento de 60 meses; a taxa de recorrência de doença foi significativamente associada à densidade de neutrófilos infiltrados. Mostrou-se relação significativa, também, à análise de sobrevida univariada: a sobrevida global, em cinco anos, foi de 77,5% para o grupo “*TAN-low*” (baixa densidade de infiltração), 58,7% para o grupo “*TAN-med*” (infiltração moderada) e 17% para o grupo “*TAN-high*” (alta densidade); a sobrevida livre de progressão, para o mesmo período, foi estimada em 73,8%, 50,7% e 11,3%, respectivamente (106). Utilizando a mesma estratificação, não observamos diferença significativa em sobrevida à análise da infiltração linfocitária. Em adição, ao nosso conhecimento, a avaliação da expressão no PD-L1 em infiltrados linfocitários não tinha sido previamente explorada em neoplasias cervicais. Não encontramos impacto da sua positividade em volume de infiltrado ou relação com sobrevida.

Karim et al. publicaram a primeira investigação do eixo PD-1/PD-L1 direcionada ao câncer de colo uterino, quando relacionada a marcadores linfocitários. Dentre suas 115 amostras cervicais avaliadas, a idade mediana foi 48,5 anos, todas as pacientes foram submetidas à ressecção cirúrgica e 51 receberam radioterapia adjuvante por critérios de alto risco (128). A avaliação da densidade e subtipo do infiltrado linfocitário por milímetro quadrado tumoral foi determinada na mesma coorte e apresentada em publicação precedente (104). O volume de infiltração, por cada tipo celular, foi dividido entre baixo e alto, balizado pelo percentil 50; 66% da amostra apresentou alta taxa de infiltração por linfócitos CD8+, 54% CD4+, 59% FoxP3+. A proporção linfocitária T CD8+/FoxP3+ representou fator prognóstico positivo independente para sobrevida. O PD-L1 esteve associado à maior infiltração intraepitelial por células T FoxP3+ ( $p = 0,022$ ), mas não por linfócitos T CD8+ ( $p = 0,162$ ) ou CD4+ ( $p = 0,060$ ). Não se observou impacto à análise da expressão do PD-L1 *versus* sobrevida global ( $p = 0,690$ ); entretanto, à análise de subgrupo celular, a sobrevida global de pacientes com tumores PD-L1-positivos e infiltrados com proporção linfocitária CD8+/FoxP3+ baixa foi significativamente melhor do que tumores PD-L1-negativos e proporção linfocitária CD8+/FoxP3+ baixa ( $p = 0,033$ ). Sob inicial concordância, nosso estudo reproduz estes resultados ao falhar em demonstrar impacto da expressão do PD-L1 tumoral em sobrevida global ou livre de progressão. Estes autores chamam atenção para a ressalva de que apenas pacientes em estádios clínicos IB-II foram incluídos em sua análise e que a expressão do PD-L1 pode ser diferente em cenários mais avançados. Não obstante, a expressão do PD-L1 foi observada em 19% das suas amostras(128) e em 32,2% ( $n = 19$ ) dos nossos espécimes. Nosso estudo incluiu pacientes sob estádios clínicos III e IV e, à análise de subgrupo, tão pouco foi encontrado impacto na prevalência da expressão do biomarcador ou em desfechos de sobrevida. Em contraste, nossas análises linfocitárias não reproduzem os eventos demonstrados pelos autores: a imunorreatividade para o FoxP3 em infiltrados imunes não modificou *endpoints* oncológicos. Ademais, a expressão do PD-L1 nos espécimes tumorais cervicais não pareceu induzir a *upregulation* do FoxP3 em seus infiltrados linfocitários. Entretanto, a considerável expressão de FoxP3 observada em 93,2% ( $n = 55$ ) dos

infiltrados linfocitários – irrespectiva da expressão de PD-L1 – sugere que a inibição do FoxP3 possa ser uma via inibitória terapêutica a ser explorada neste cenário.

Quanto à terapêutica vigente, escassos e preliminares são os resultados de inibidores de *checkpoint* em neoplasias cervicais. Um estudo, em andamento, de fase I (NCT01711515), está avaliando o efeito do ipilimumab em pacientes com câncer de colo uterino, sob estadios clínicos IB2-IIA (desde que apenas os linfonodos para-aórticos estejam comprometidos), ou estadios IIB, IIB e IVA, após quimiorradiação (incluindo braquiterapia). Outro estudo, de fase II (NCT01693783), está avaliando segurança e eficácia do ipilimumab em pacientes sob estadio clínico IV. Resultados preliminares da coorte que incluiu carcinomas cervicais do estudo KEYNOTE-028 foram apresentados no Congresso Americano de Oncologia Clínica (ASCO) de 2016. O uso de pembrolizumab, em monoterapia, resultou em taxas de sobrevida livre de progressão, em seis meses, de 13% e de sobrevida global, no mesmo período, de 66,7%. A expressão do PD-L1  $\geq 1\%$  foi considerada como critério de inclusão (108). Na edição de 2017, foram apresentados os primeiros resultados do estudo multicorte de fase I/II (ainda em andamento) de nivolumab (CHECKMATE-358) em pacientes com tumores metastáticos vírus-associados – colo uterino, vulva e vagina. As pacientes não foram PD-L1-selecionadas. Dentre as 24 pacientes tratadas, 19 (79,2%) portavam neoplasia cervical. À mediana de follow-up de 31 semanas, a taxa de resposta objetiva foi de 20,8% – todas as respostas registradas foram em pacientes com câncer de colo uterino e não se demonstrou relação com o *status* do PD-L1, HPV ou número de exposição a linhas terapêuticas prévias (109). Por último, dados atualizados do braço do estudo KEYNOTE-168 que incluiu pacientes com neoplasia cervical, foram revelados no ASCO de 2018: dentre as 98 pacientes receberam pembrolizumab, 83% apresentavam positividade para o PD-L1. Apenas 13 respostas foram observadas (taxa de resposta objetiva de 16%), todas eram PD-L1 positivas e nove (dentre as 13) respostas mantinham-se após nove meses de seguimento.

### 3.5 CONCLUSÃO

Atualmente, a comunidade científica oncológica enfrenta dilemas na seleção entre as múltiplas tecnologias contemporâneas antineoplásicas pesando indicação, histologias, combinações, sequenciamentos e fardo econômico – o custo é, frequentemente, proibitivo para seu acesso indiscriminado. É iminente a identificação dos pacientes potencialmente respondedores e da dependência de resposta a perfis moleculares tumorais específicos; torna-se imperativa a busca por biomarcadores que predigam benefício terapêutico. Deve-se ressaltar que o PD-L1 é um biomarcador falho – métodos atualmente disponíveis não conseguem identificar, assertivamente, respondedores e não respondedores. A sensibilidade e especificidade dos ensaios são insuficientes; estima-se que sua aplicação inadvertida excluiria ~28% de indivíduos que se beneficiariam do tratamento com imunoterapia e incluem até 42% de pacientes que não apresentam benefício clínico. Além disso, a imuno-histoquímica, sozinha, não leva em conta fatores que poderiam modificar respostas terapêuticas, como a real interação entre células imunes e o PD-1, no microambiente tumoral, a presença de vias imunes supressoras concomitantes (FoxP3+, IDO, LAG3, por exemplo). Assim, a expressão do PD-L1 não deveria, sozinha, determinar exclusão de pacientes para tratamento. Os resultados aqui demonstrados, entretanto, enfraquecem o eixo PD-1/PD-L1 como racional biológico antineoplásico no cenário da neoplasia cervical e motivam outros comensurativos imunes como potenciais alternativas terapêuticas e de pesquisa básica.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados negativos oriundos da associação entre a expressão do PD-L1, somada à avaliação linfocitária, e desfechos de sobrevida devem, sim, ser avaliados com cautela, devido ao caráter retrospectivo do estudo e sua amostra limitada. Não obstante, não devem ser desprezados, visto que corroboram resultados semelhantemente demonstrados em estudos prévios e, em conjunto, enfraquecem o uso indiscriminado de agentes inibidores de *checkpoint* imune, no que tange à via PD-1/PD-L1 no cenário da neoplasia cervical.

Reforçando o que fora citado no artigo original, a comunidade científica oncológica enfrenta dilemas na seleção entre as múltiplas tecnologias contemporâneas antineoplásicas pesando indicação, histologias, combinações, sequenciamentos e fardo econômico – o custo é, frequentemente, proibitivo para seu acesso indiscriminado. É iminente a identificação dos pacientes potencialmente respondedores e da dependência de resposta a perfis moleculares tumorais específicos; torna-se imperativa a busca por biomarcadores que predigam benefício terapêutico. Deve-se ressaltar que o PD-L1 é um biomarcador falho – métodos atualmente disponíveis não conseguem identificar, assertivamente, respondedores e não respondedores. A sensibilidade e especificidade dos ensaios são insuficientes; estima-se que sua aplicação inadvertida excluiria ~28% de indivíduos que se beneficiariam do tratamento com imunoterapia e incluem até 42% de pacientes que não apresentam benefício clínico. Em geral, biomarcadores são baseados em avaliações unitárias; talvez, a combinação entre fatores possa qualificar o uso de biomarcadores na prática clínica. Hipotetiza-se, inclusive, que devido ao dinamismo das respostas imunológicas, é improvável que um único biomarcador seja capaz de prever respostas aos agentes imunológicos. Ademais, deve-se questionar se a identificação de subgrupos potencialmente imunogênicos, biologicamente distintos entre si é realmente necessária, quando não se observa impacto em desfechos de sobrevida (quando não há imunoterapia vigente).

O melhor entendimento da biologia imune inata câncer-relacionada vem viabilizando a promoção de imunidade anti-neoplásica de modo a se alcançarem respostas duráveis – quiçá a erradicação tumoral completa. Pesquisa básica, especialmente nas áreas de oncogenômica, metabolômica e proteômica devem, em um

futuro próximo, aproximar o racional científico, baseado na relação sistema imune x câncer, de estratégias terapêuticas adequadamente direcionadas e responsáveis.