

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES EM PI3K E GENÓTIPO DE HPV
EM PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL ASSOCIADOS A
DEFECOS CLÍNICOS E DE SOBREVIDA**

Janaína Brollo

Caxias do Sul, RS
2019

Janaína Brollo

**Avaliação das mutações em PI3K e do genótipo de HPV em
pacientes com câncer cervical associados
a desfechos clínicos e de sobrevida**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre
em Biotecnologia”

Orientação: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely/ Prof. Dr. João Antonio Pêgas
Henriques

Caxias do Sul, RS
2019

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

B867a Brollo, Janaína

Avaliação das mutações em PI3K e do genótipo de HPV em pacientes com câncer cervical associados a desfechos clínicos e de sobrevida / Janaína Brollo. – 2019.

64 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Mariana Roesch Ely, João Antonio Pêgas Henriques.

1. Câncer - Tratamento. 2. Papilomavírus. 3. Epidemiologia. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Henriques, João Antonio Pêgas, orient. III. Título.

CDU 2. ed.: 616-006

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

JANAINA BROLLO

**AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES EM PI3K E GENÓTIPO DE HPV
EM PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL ASSOCIADOS A
DEFECOS CLÍNICOS E DE SOBREVIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dra. Mariana Roesch Ely e Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17 DE DEZEMBRO DE 2019.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Lessandra Michelim

Prof. Dra. Márcia Rosângela Wink

Prof. Dr. Renato Luiz Rombaldi

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Maximiliano e minha filha Victoria, que são minha alegria de viver, minha base e minha maior motivação para seguir em frente e me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus amados pais, minha irmã e ao meu cunhado pelo apoio incondicional de sempre em todas etapas da minha vida.

Aos professores Henriques e Mariana pelos ensinamentos, paciência e confiança ao longo das supervisões das minhas atividades no mestrado. Para cara amiga e Professora Lessandra pelo incentivo e por seus ensinamentos ao longo da minha caminhada desde a graduação, minha formação não teria sido a mesma sem a sua presença.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto do esforço, dedicação e colaboração de muitas pessoas. À todas elas minha imensa gratidão.

Obrigada a todos os professores do Programa de pós-graduação do Instituto de Biotecnologia pelos ensinamentos e dedicação, obrigada pela gentil acolhida e oportunidade.

Agradeço imensamente à querida Lucimara Serafim pelo apoio incondicional e pela amizade.

Á toda equipe do Grupo Diagnose e em especial à Dra. Jovana Mandelli e ao Dr. Guilherme Coelho pelo apoio fundamental e parceria na realização deste trabalho.

Á Professora Scheila de Ávila e Silva e ao Professor Diego Gnatta pela acessoria estatística.

E finalmente e em especial, às minhas queridas pacientes, por me motivarem e me inspirarem diariamente na busca incessante por novos conhecimentos.

ÍNDICE

Lista de Tabelas -----	8
Lista de Figuras -----	9
Resumo -----	10
Abstract -----	11
Siglas e abreviaturas -----	12
1. Introdução -----	13
2. Objetivos -----	14
3. Revisão Bibliográfica -----	14
3.1 Epidemiologia do câncer de colo uterino -----	14
3.2. Características anatomopatológicas -----	17
3.2.1 Lesões pré-cancerosas -----	17
3.2.2 Carcinoma epidermoide -----	18
3.2.3 Adenocarcinoma -----	18
3.3. Fatores de Risco -----	19
3.3.1. O Papilomavírus Humano (HPV) -----	19
3.3.2. Outros fatores de risco -----	21
3.4. Prevenção primária do câncer de colo uterino -----	21
3.5. Prevenção secundária do câncer de colo uterino -----	23
3.6. Fatores prognósticos e história natural da doença -----	24
3.7. Diagnóstico do carcinoma invasor -----	25
3.8. Diagnóstico da Infecção pelo vírus HPV -----	25
3.9. Estadiamento do câncer cervical -----	26
3.10. Sobrevida do câncer de colo uterino -----	29
3.11. Tratamento do câncer cervical -----	29
3.12. Alterações genéticas no câncer de colo uterino -----	30
3.13. Via de sinalização da PI3K/AKT/mTOR -----	31
3.13.1 PI3K estrutura e função -----	32
3.13.2 AKT estrutura e função -----	33
3.13.3 PTEN estrutura e função -----	34
3.13.4 Mutação do PI3K e neoplasias malignas -----	35
3.13.5. Mutações em PI3K -----	36
3.13.6. Inibidores de PI3K – Alpelisib -----	37
4. Material e Métodos -----	38

4.1. Quadro Amostral e parâmetros clínicos -----	38
4.2. Análise Molecular -----	39
4.2.1 Extração de material genético -----	39
4.2.2 Detecção das mutações no gene PI3K -----	40
4.2.3 Detecção da presença do papilomavírus (HPV) -----	40
4.3. Aspectos Éticos -----	41
4.4. Aspectos Estatísticos -----	41
5. Resultados -----	42
6. Discussão -----	47
7. Conclusões -----	51
8. Perspectivas -----	52
9. Referências Bibliográficas -----	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das funções específicas de cada gene do HPV.

Tabela 2 - Estadiamento do câncer de colo uterino – FIGO 2009.

Tabela 3 - Estimativa de sobrevida do câncer cervical em 5 anos de acordo com estágio clínico.

Tabela 4 - Mutações em PI3K avaliadas.

Tabela 5 - Iniciadores e sondas utilizados.

Tabela 6 - Características clínico-patológicas das pacientes.

Tabela 7 - Status do genótipo de HPV 16/18 da população avaliada.

Tabela 8 - Status das mutações em PI3K da população avaliada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018, por sexo, exceto pele não melanoma.

Figura 2 - Taxa de mortalidade ajustada pela população mundial por câncer do colo do útero. Regiões. Brasil, 1980 a 2016.

Figura 3 - Taxas brutas de mortalidade por câncer do colo do útero segundo grupo etário. Brasil e regiões, 2016.

Figura 4 - Representação do estadiamento do câncer de colo uterino – FIGO 2009.

Figura 5 - Estrutura molecular e mecanismo de ativação da PI3K e suas subunidades.

Figura 6 - Representação esquemática do papel de *PTEN* como regulador da via PI3K.

Figura 7 - *Hotspots* de mutação em *PI3K*.

Figura 8 - Fluxograma de recrutamento da coorte.

Figura 9 - Estimativa de Sobrevida Livre de Progressão nas pacientes com neoplasia cervical - Kaplan-Meier.

Figura 10 - Estimativa de Sobrevida Global nas pacientes com neoplasia cervical - Kaplan-Meier

Figura 11 - Curvas de Kaplan-Meier e teste de log-rank segundo análise de sobrevida global de pacientes com neoplasia cervical, baseada no status da presença de mutação em PI3K.

RESUMO

Objetivos: Avaliar pacientes portadoras de câncer de colo uterino diagnosticadas e tratadas numa instituição de referência em oncologia e analisar as características clínico-patológicas, tratamentos realizados, desfechos de sobrevida, genótipo do HPV e status da mutação em PI3K; relacionando o genótipo do HPV e o status da mutação do PI3K com as demais características avaliadas nesta população.

Métodos: Estudo observacional de coorte, retrospectivo, que avaliou as pacientes tratadas no período de 01 de janeiro de 2012 até 31 de dezembro de 2016. As pacientes foram identificadas e foram resgatados os blocos de parafina para análise molecular. Os dados clínicos e de sobrevida foram coletados, digitalizados e analisados.

Resultados: 58 pacientes foram incluídas nesta análise. A mediana de idade foi de 44 anos e 29,3% (n=17) das pacientes eram tabagistas. O subtipo histológico predominante foi carcinoma epidermóide (88%, n=51) e 64% (n=37%) estavam em performance status (PS) 1. A maior parte das pacientes encontrava-se em EC avançados, 29,3% (n=17) em EC III e 48,3% (n=28) em EC IV, respectivamente. Com uma mediana de seguimento de 22,8 meses, a sobrevida livre de progressão em 1 ano e 3 anos foi de 66% e 44,8%, respectivamente. A sobrevida global em 1 ano e 3 anos foi de 79,2% e 63,4%, respectivamente. 40 (69%) apresentaram positividade para HPV16/HPV18 e não foi observado relação estatística significativa associando o genótipo de HPV às características clínico-patológicas da população e à sobrevida global, HPV 16 (p=0,550) e HPV 18 (p=0,594), respectivamente. Dos 58 casos analisados, 17 (29,3%) apresentaram mutação em PI3K, sendo a mais frequente p.E545K (éxon 9), encontrada em 12 (20,7%) pacientes. Não foi observado relação estatística significativa associando a presença de mutação em PI3K às características clínico-patológicas das pacientes e à sobrevida global (p=0,487).

Conclusão: A população de pacientes portadoras de câncer cervical apresentou um perfil de doença diagnosticada em fases mais avançadas (EC III e IVA) e com características clínicas agressivas. A prevalência de mutação em PI3K e dos genótipos de HPV 16 e 18 foi de 29,3% e 69%, respectivamente. Não foi identificada significância estatística quando se analisou a presença de mutação em PI3K e/ou genótipo de HPV com as características clínico-patológicas e desfechos de sobrevida global das pacientes.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate cervical cancer patients diagnosed and treated at an oncology reference institution and to analyze clinical and pathological features, survival outcomes, HPV genotype and PI3K mutation status; relating to HPV genotype and PI3K mutation status with other characteristics in this population.

Methods A retrospective observational cohort study evaluating patients treated from January 1st 2012 until December 31th 2016. Patients were identified and paraffin blocks were rescued to molecular analysis. Clinical and survival data were collected and analyzed.

Results: 58 patients were included in this study. The median age was 44 years; 29.3% of the patients were smokers. The predominant histological subtype was squamous cell carcinoma (88%) and 64% of the patients were on PS1. Most patients were in advanced clinical stages, 29.3% in CS III and 48.3% in CS IV, respectively. The median follow-up was 22.8 months, 1-year and 3-year estimated progression-free survival was 66% and 44.8%, respectively. The 1-year and 3-year estimated overall survival was 79.2% and 63.4%, respectively. 40 (69%) patients showed HPV16 / HPV18 positivity and there was no statistically significant relationship between HPV status and the clinical-pathological population features and overall survival outcome, HPV 16 ($p = 0.550$) and HPV 18 ($p = 0.594$), respectively. Of the 58 cases analyzed, 17 (29.3%) presented PI3K mutation, being more frequent p.E545K (exon 9), found in 12 (20.7%) patients. There was no statistical relationship associated PI3K mutation with clinical-pathological characteristics and overall survival outcome ($p = 0.477$).

Conclusion: The cervical cancer patient population presented a disease profile diagnosed at more advanced stages (CS III and IVA) and aggressive clinical characteristics. PI3K mutations and HPV genotype 16/18 prevalence was 29.3% and 69%, respectively. No statistical significance was identified between PI3K mutations and HPV genotype 16/18 with clinical-pathological features and survival outcomes.

SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC – Do inglês *American Joint Committee on Cancer*
AKT - Do inglês *Protein Kinase B*
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
COEDI - Conselho Científico e Editorial do Hospital Geral
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EBV – Epstein-Barr vírus
EC – Estágio clínico
EGFR - Do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*
FDA – Do inglês *Food and Drug Administration*
FEBRASGO – Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia
FGFR – Do inglês *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FIGO - Do inglês *International Federation of Gynecology and Obstetrics*
HER2 – Do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*
HIV – Do inglês *Human Immunodeficiency Virus*
HPV – Do inglês *Human papiloma virus*
IGF-1R – Do inglês *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*
INCA – Instituto Nacional do Câncer
Kb - Quilobyte
KRAS – Do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
LCR – Do inglês *large control region*
MMAC1 – Do inglês *Mutated in Multiple Advanced Cancer 1*
mTOR - Do inglês *Mammalian Target of Rapamycin*
NIC 1 – Neoplasia intra-epitelial cervical I
NIC 2 – Neoplasia intra-epitelial cervical II
NIC 3 – Neoplasia intra-epitelial cervical III
NIP - neoplasia intraepitelial peniana
NIV- intra-epitelial vulvar
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORF – Do inglês *open reading frame*
PCR - Do inglês *Polimerase Chain Reaction*
PET-CT – Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2 – Do inglês *Phosphatidylinositol-4,4-biphosphate*
PIP3 – Do inglês *phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate*
PKA – Do inglês *Protein kinase A*
PKB – Do inglês *Protein kinase B*
PKC – Do inglês *Protein kinase C*
PTEN - Do inglês *Phosphatase and Tensin homolog*
Rb – Retinoblastoma
RM – Ressonância magnética
RNA – Ácido Ribonucleico
SPSS – Do inglês *Statistical Package for the Social Sciences Software Package*
TC – Tomografia computadorizada
TCGA – Do inglês *The Cancer Genome Atlas*
TEP1 – Do inglês *Telomerase Protein Component 1*
TP53 - Do inglês *Tumor protein p53*
VEGF - Do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*
VLPs – Do inglês *Virus like particulas*
WHO – Do inglês *World Health Organization*

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino apresenta-se com elevada incidência e mortalidade e tem se tornado relevante problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, em que é responsável pela terceira causa de morte por câncer entre as mulheres (WHO, 2018). O câncer cervical foi responsável por aproximadamente 560 mil novos casos de câncer no mundo em 2018 e 266 mil mortes em mulheres em 2012, sendo 90% destes óbitos oriundos de países em desenvolvimento (WHO, 2018; Torre *et al.* 2012; INCA, 2019). Em 2015, estimou-se 74.488 novos casos na América Latina e 31.303 mulheres morreram desta doença (WHO, 2018). No Brasil, é a segunda neoplasia ginecológica mais incidente na mulher, sendo a mortalidade bastante expressiva (INCA, 2019).

É indiscutível a associação do papilomavírus humano (HPV) com o carcinoma cervical (Brinton *et al.*, 2002; Bruni *et al.*, 2010; Ghittoni *et al.*, 2015; Boda *et al.*, 2018). Sabe-se que os subtipos de HPV estão diretamente associados ao câncer cervical (Brinton *et al.*, 2002; Ghittoni *et al.*, 2015), porém os dados apresentados na literatura referente à incidência dos subtipos de HPV ainda são escassos nas heterogêneas populações de pacientes e diferentes regiões (Bruni *et al.*, 2010; Ghittoni *et al.*, 2015, Boda *et al.*, 2018). Outro ponto de discussão e de dados conflitantes é se os diferentes genótipos de HPV têm implicação na apresentação clínica, bem como nas resposta aos tratamentos, desfechos de sobrevida das pacientes e ligação com outras vias de sinalização. Sabe-se que as pacientes infectadas pelo HPV podem ou não desenvolver a neoplasia e existe uma lacuna no conhecimento a ser preenchida para a compreensão deste processo, visto que algumas pacientes com o mesmo subtipo de câncer e mesmo genótipo de HPV relacionado possui desfecho clínico distinto a despeito do tratamento ideal realizado.

Estudos recentes têm demonstrado que mutações somáticas podem estar diretamente relacionadas à patogênese do câncer cervical. A via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3K*), via *PI3K/AKT/mTOR*, está frequentemente alterada em diversas neoplasias malignas (Karakas *et al.*, 2006; Samuels and Waldman, 2010; Ojesina *et al.*, 2014), estando intimamente relacionada com metastatização, angiogênese, progressão do ciclo celular, crescimento tumoral e resistência aos tratamentos (Gonçalves *et al.*, 2018; Karakas *et al.*, 2006; Samuels and Waldman, 2010, Ojesina *et al.*, 2014). Essa via de sinalização é crucial em muitos aspectos de crescimento celular e sobrevida, tanto em condições fisiológicas como patológicas, e vem ganhando atenção

especial nos estudos clínicos na carcinogênese das neoplasias. Em câncer de colo uterino, recentemente as mutações somáticas começaram a ser mais estudadas, tratando-se de uma abordagem que merece ser melhor analisada. A mutação em PI3K é reportada como a mais frequente alteração genética em câncer cervical, seguida por KRAS, EGFR e perda do PTEN (Gonçalves *et al.*, 2018; Ojesina *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma coorte de pacientes portadoras de câncer de colo uterino diagnosticadas e tratadas numa instituição de referência em oncologia e analisar as características clínico-patológicas, tratamentos realizados, desfechos de sobrevida, genótipo do HPV e status da mutação em PI3K e relacionar o genótipo do HPV e o status da mutação do PI3K com as demais características avaliadas nesta população estudada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Epidemiologia do câncer de colo uterino

O câncer de colo de útero apresenta-se como uma neoplasia prevalente e incidente no mundo, ocupando local de destaque entre as doenças oncológicas no sexo feminino (WHO, 2018). Globalmente, no ano de 2018, o carcinoma de colo uterino apresentou incidência de 560 mil casos novos em todo o mundo. Dentre todos os óbitos, 90% ocorreram em países em desenvolvimento, onde as condições de detecção precoce e rastreamento, muitas vezes, são escassas ou inexistem (WHO, 2018).

No Brasil, estimou-se a ocorrência de 16.370 novos casos em 2018, com aumento de 780 casos desde 2014 (INCA, 2019). Representa a terceira localização primária de incidência e de mortalidade por câncer em mulheres no país, excluindo-se tumores de pele não melanoma (**Figura 1**) (INCA, 2019). Em 2016, ocorreram 5.847 óbitos por esta neoplasia, representando uma taxa de mortalidade ajustada para a população mundial de 4,70 óbitos para cada 100 mil mulheres.

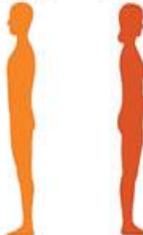
Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018, por sexo, exceto pele não melanoma: fonte: INCA 2019.

As taxas de incidência estimada e de mortalidade no Brasil apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento, porém são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoce bem estruturados. Países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas, enquanto países da América Latina e, sobretudo, de regiões mais pobres da África, apresentam valores bastante elevados (WHO, 2018). Segundo o Globocan (documento que apresenta dados estatísticos referentes a 36 tipos de câncer em 185 países, divididos em 20 regiões mundiais) cerca de 85% dos casos de câncer do colo do útero ocorrem nos países menos desenvolvidos e a mortalidade por este câncer varia em até 18 vezes entre as diferentes regiões do mundo, com taxas de menos de 2 por 100.000 mulheres, na Ásia Ocidental e de 27,6 na África Oriental (WHO, 2018).

Na análise regional, o câncer do colo do útero se destaca como o primeiro mais incidente na região Norte do Brasil, com 23,97 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2019). Nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, ele ocupa a segunda posição, com taxas de 20,72/100 mil e 19,49/100 mil, respectivamente, e é o terceiro mais incidente na região Sudeste (11,3/100 mil) e quarto na Sul (15,17/100 mil) (INCA, 2019).

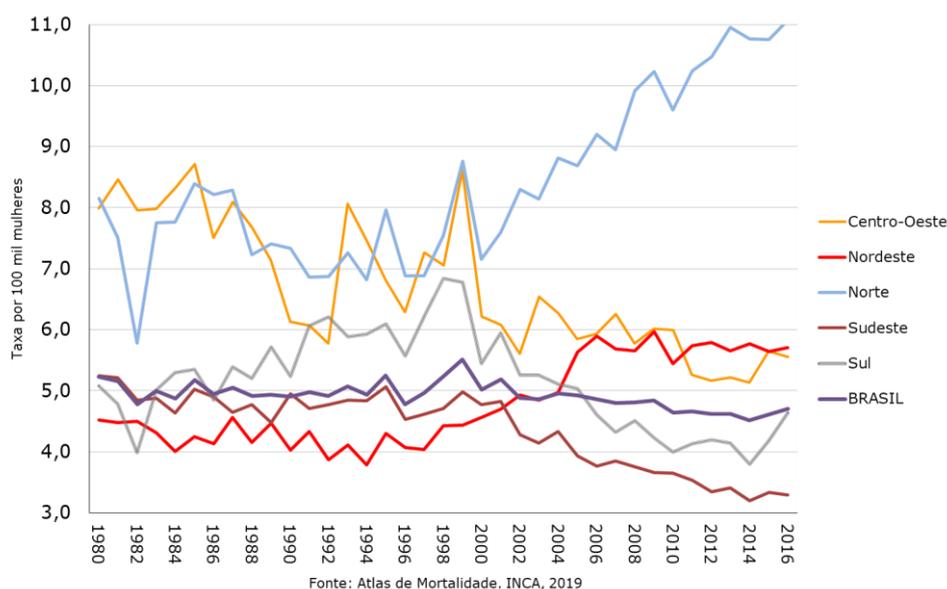


Figura 2. Taxa de mortalidade ajustada pela população mundial por câncer do colo do útero. Regiões. Brasil, 1980 a 2016.

Quanto à mortalidade, é também na região Norte que se evidenciam as maiores taxas do país, sendo a única com nítida tendência temporal de crescimento (INCA, 2019) (*Figura 2*). Em 2016, a taxa padronizada pela população mundial foi de 11,07 mortes por 100.000 mulheres, representando a primeira causa de óbito por câncer feminino nesta região. Nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, onde este câncer representou a terceira causa, as taxas de mortalidade foram de 5,71/100 mil e 5,55/100 mil (INCA, 2019). As regiões Sul e Sudeste tiveram as menores taxas (4,64/100 mil e 3,29/100 mil) representando a sexta colocação entre os óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2019).

O câncer do colo do útero é raro em mulheres até 30 anos e o pico de sua incidência se dá na faixa etária de 45 a 50 anos. A mortalidade aumenta progressivamente a partir da quarta década de vida, com expressivas diferenças regionais, conforme apresentado na *Figura 3* (INCA, 2019).

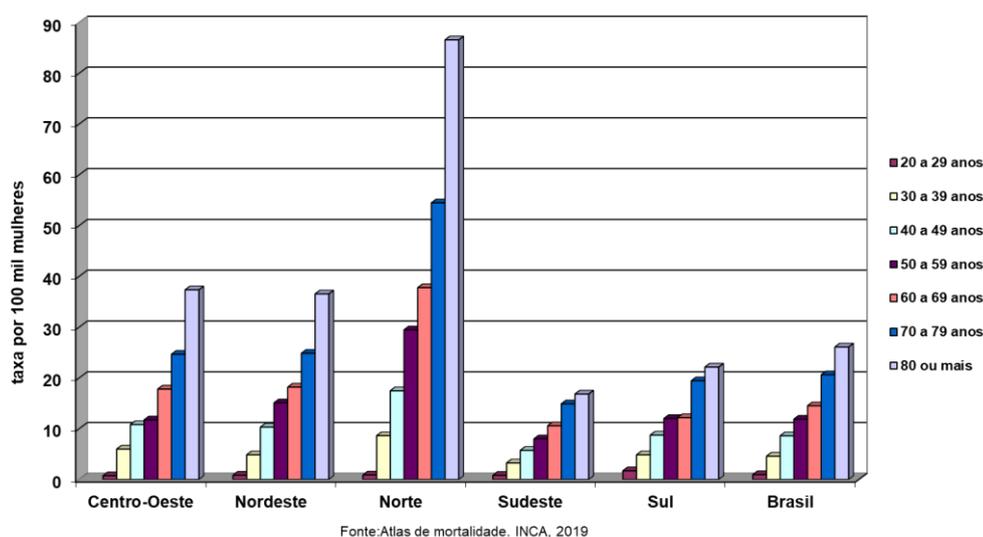


Figura 3. Taxas brutas de mortalidade por câncer do colo do útero segundo grupo etário. Brasil e regiões, 2016.

3.2. Características anatomopatológicas

3.2.1 Lesões pré-cancerosas

O carcinoma invasivo é precedido por neoplasia intraepitelial cervical escamosa (NIC) ou adenocarcinoma *in situ* e pode evoluir para invasão, num processo geralmente lento. As lesões pré-cancerosas mais frequentes são relacionadas a células escamosas, as NIC, que são graduadas de acordo com a proporção de epitélio anormal. A NIC1 é uma lesão induzida por HPV e é considerada lesão de baixo grau com alto índice de regressão espontânea (Boda *et al.*, 2018; Saslow *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2007). Em geral, mulheres com NIC1 não precisam ser tratadas. A NIC2 é considerada uma lesão de alto grau, porém apresenta remissão espontânea em cerca de 40% dos casos. Já a NIC3 tem as maiores probabilidades de evolução para câncer e essas lesões são universalmente tratadas. Cerca de 30% a 70% das mulheres com NIC3 ou adenocarcinoma *in situ* não tratadas podem progredir para carcinoma invasor num período de até 20 anos (Saslow *et al.*, 2012, Kumar *et al.*, 2007). Menos de 10% dos casos podem evoluir de NIC3 ou adenocarcinoma *in situ* para invasor em um ano ou menos. Ao invadir o estroma, o carcinoma manifesta-se como úlcera, lesão exofítica ou infiltração profunda em tecidos adjacentes (Boda *et al.*, 2018; Saslow *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2007).

3.2.2 Carcinoma epidermoide

O carcinoma espinocelular representa 85 a 90% dos carcinomas invasivos do colo uterino, seguido na frequência por adenocarcinoma, adenoescamoso e mais raramente, o sarcoma (Kumar *et al.*, 2007). A quase totalidade dos carcinomas tem sua origem na junção escamocolunar e pode envolver células do epitélio escamoso, glandular ou de ambos (Kumar *et al.*, 2007). A maioria dos carcinomas do colo do útero são carcinomas epidermóides do tipo usual, relacionados à infecção pelo HPV (Kumar *et al.*, 2007). Baseando-se na extensão da diferenciação escamosa, estas neoplasias podem ser classificadas em bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas e pouco diferenciadas. Em sua apresentação usual, podem ser ceratinizantes ou não ceratinizantes, apresentando ninhos ou lençóis de células escamosas poligonais (Kumar *et al.*, 2007). O pleomorfismo nuclear e as figuras de mitose são, de um modo geral, mais evidentes nos tumores de alto grau histológico. As variantes histológicas do carcinoma epidermoide cervical são:

- Basaloide: são tumores raros, agressivos, caracterizados por extensas ilhas sólidas de células neoplásicas imaturas (Grayson and Cooper, 2012);
- Verrucoso: esta variante, bem mais comum na região vulvar, apresenta-se como uma neoplasia bem diferenciada, de arquitetura pilífera e abundante ceratinização, com padrão de crescimento expansivo ao invés de infiltrativo. Apresentam uma tendência à recorrência tumoral após excisão cirúrgica, mas não costumam exibir metástases (Degefu *et al.*, 1986);
- Papilífero: Costumam ocorrer em mulheres no final da fase reprodutiva ou na pós-menopausa, sendo observadas grandes massas exofíticas com excrescências papilíferas (Mirhashemi *et al.*, 2003);
- Linfopitelioma-símile: trata-se de uma variante rara, semelhante à lesão de mesmo nome da rinofaringe. É composta por ninhos de células escamosas pouco diferenciadas, de permeio a exuberante infiltrado inflamatório linfocitário. O prognóstico parece ser melhor do que o carcinoma epidermoide usual. É comum a associação com o Vírus Epstein-Barr (EBV) (Chao *et al.*, 2009).

3.2.3 Adenocarcinoma

Os adenocarcinomas são infreqüentes, sendo o mais comum o adenocarcinoma endocervical usual que é responsável por 90% das lesões deste subgrupo. No entanto,

tem se observado em recentes estudos uma incidência crescente no adenocarcinoma, principalmente em mulheres jovens e em países desenvolvidos. A justificativa para este acréscimo deve-se provavelmente à maior sensibilização das mulheres a programas de rastreio e a adaptações da classificação citológica de Bethesda, as quais tornaram clara a categoria das alterações glandulares do colo uterino (Kumar *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2013; Fujiwara *et al.*, 2014).

3.3. Fatores de Risco

3.3.1 O Papilomavírus Humano (HPV)

A causa do câncer cervical está relacionada diretamente com a infecção do HPV, que é responsável por 99,7% dos casos de câncer de colo uterino (Brinton *et al.*, 2002; Bruni *et al.*, 2010; Ghittoni *et al.*, 2015; Boda *et al.*, 2018). A transmissão do vírus se dá por contato direto com a pele ou mucosa infectada. A principal forma é pela via sexual, que inclui contato oral-genital, genital-genital ou mesmo manual-genital. Assim sendo, o contágio com o HPV pode ocorrer mesmo na ausência de penetração vaginal ou anal. A transmissão do vírus da mãe para o bebê durante o parto é rara, mas pode ocorrer (Boda *et al.*, 2018).

O vírion do papilomavírus humano é um vírus DNA, da Família do *Papillomaviridae*, não envelopado, com 72 capsômeros. Possui capsídeo com 55nm de diâmetro e apresenta-se de forma icosaédrica. Seu genoma é circular, composto por dupla fita de DNA com comprimento de 7.900 Kb e massa de 5.000 KDa. Contem nove janelas de leitura (open reading frame – ORF), nas quais se posicionam tanto os genes de leitura precoce (early) E1, E2, E4, E5, E6 e E7, quanto aqueles de leitura tardia (late), L1 e L2. Há também uma região não codificadora (large control region – LCR) que controla os demais genes. Cada um dos genes virais atua transcrevendo proteínas de funções diferentes, conforme Tabela 1 (Zur Hausen, 2002; Garland *et al.*, 2007; Faridi *et al.*, 2011; Ghittoni *et al.*, 2015, Boda *et al.*, 2018).

O HPV-DNA também foi encontrado em abortos, anormalidades genéticas fetais e parto prematuro. A frequência de transmissão vertical do HPV é baixa (2,8%). A principal complicação de transmissão vertical é a papilomatose juvenil, uma neoplasia rara e benigna da laringe que provoca rouquidão e desconforto respiratório em crianças, associada aos HPVs subtipos 6 e 11 (Arena *et al.*, 2002; Boda *et al.*, 2018). A incidência é de 4 por 100 mil crianças, sendo que 7 de cada 1.000 recém nascidos de mulheres com condiloma genital irão desenvolvê-la na infância. A condilomatose vaginal na gestante

umenta o risco de papilomatose juvenil, porém esta condição não justifica a indicação de cesárea, visto que a infecção pode ser transmitida durante a gravidez e a cesárea não tem efeito protetor (Arena *et al.*, 2002; Boda *et al.*, 2018).

Existem por volta de 200 subtipos de HPV conhecidos; destes, 40 parecem ser oncogênicos. Os subtipos 16 e 18 são responsáveis por mais de 70% de todos os cânceres cervicais, porém os subtipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 também são genótipos de alto risco implicados no desenvolvimento da neoplasia e parece que os subtipos 31, 33, 45, 52 e 58 são responsáveis por 19% dos casos de câncer cervical (Faridi *et al.*, 2011; Parkin and Brey, 2006; Li *et al.*, 2011; Boda *et al.*, 2018). Contudo, muitas das infecções causadas pelo HPV são transitórias e o vírus sozinho não é capaz de causar neoplasia, apresentando regressão espontânea entre seis meses a dois anos após a exposição (Faridi *et al.*, 2011; Parkin and Brey, 2006).

A infecção pelo HPV é muito comum. Estima-se que cerca de 80% das mulheres sexualmente ativas irão adquiri-la ao longo de suas vidas (Faridi *et al.*, 2011; Parkin and Brey, 2006; Li *et al.*, 2011; Boda *et al.*, 2018). Aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras do HPV, sendo que 32% estão infectadas pelos subtipos 16, 18 ou ambos (Boda *et al.*, 2018). Comparando-se esse dado com a incidência anual de aproximadamente 500 mil casos de câncer de colo do útero, conclui-se que o câncer é um desfecho raro, mesmo na presença da infecção pelo HPV. Ou seja, a infecção pelo HPV é um fator necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento do câncer cervical uterino e temos lacunas no conhecimento da carcinogênese dessa neoplasia.

Em relação à incidência da infecção, no pequeno número de casos nos quais a infecção persiste e, especialmente, é causada por um subtipo viral oncogênico, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões precursoras (Faridi *et al.*, 2011; Parkin and Brey, 2006), cuja identificação e tratamento adequado possibilita a prevenção da progressão para o câncer cervical invasivo. Porém, quando a infecção persiste, são necessárias fases de transformação até o surgimento da doença maligna; o tempo entre o primeiro contato e o desenvolvimento de lesão neoplásica varia de 10 a 15 anos, caracterizando-o como uma patologia potencialmente evitável e curável (Faridi *et al.*, 2011; Parkin and Brey, 2006).

Tabela 1. Descrição das funções específicas de cada gene do HPV .

Gene	Função do gene viral
E1	Atua na replicação episomal do vírus
E2	Regula negativamente as funções das proteínas E6 e E7
E4	Produz a proteína secundária do capsídeo viral
E5	Induz a proliferação da célula infectada pelo vírus
E6	Afeta diretamente a proteína p53 da célula hospedeira via ubiquitina e mantém o comprimento da telomerase acima do seu ponto crítico, protegendo a célula contra a apoptose.
E7	Inativa a proteína pRB da célula hospedeira, impedindo o bloqueio do ciclo célula
L1	Sintetiza a proteína principal do capsídeo viral.
L2	Expressa a proteína secundária do capsídeo viral

Fonte: Garland *et al.*, 2007; Faridi *et al.*, 2011.

3.3.2 Outros fatores de risco

Alguns fatores como alta paridade, tabagismo, imunossupressão e idade precoce ao início da atividade sexual são fatores de risco independentes para progressão para o câncer cervical. A exposição intraútero ao dietilestilbestrol (DES) é um fator de risco para adenocarcinoma de colo e vagina, não associados ao HPV (FEBRASGO, 2018).

O tabagismo foi associado como fator de risco independente da atividade sexual para câncer de colo uterino em alguns estudos. A literatura sugere que o tempo de exposição ao tabaco propicia alterações no epitélio e no muco endocervical que causa danos no DNA celular, propiciando e facilitando a carcinogênese (Simons *et al.*, 1993).

3.4 Prevenção primária do câncer de colo uterino

Observando os picos de prevalência do HPV por idade (25% em mulheres com menos de 25 anos) podemos inferir que a infecção é predominantemente transmitida através da via sexual após o início da vida sexual (Boda *et al.*, 2018) Assim, a vacinação

profilática contra o HPV como uma estratégia preventiva deve primar as mulheres antes do início da vida sexual e é a principal forma de prevenção do câncer de colo uterino (Collins *et al.*, 2006; Haghshenas *et al.*, 2017; Palmer *et al.*, 2019). Atualmente, três vacinas profiláticas contra HPV estão disponíveis no mundo para uso em mulheres e homens a partir dos 9 anos de idade: a vacina bivalente visando HPV16 e HPV18; uma vacina quadrivalente visando HPV6 e HPV11, além de HPV16 e HPV18; e uma vacina nonavalente visando os tipos de HPV 31, 33, 45, 52 e 58, além de HPV 6, 11, 16 e 18. As duas últimas vacinas têm como alvo as verrugas anogenitais causadas pelo HPV 6 e 11, além das lesões malignas e pré-malignas acima mencionadas. Todas as vacinas são recombinantes compostas de partículas semelhantes a vírus (VLPs) e não são infecciosas, uma vez que não contêm DNA viral (WHO, 2017). No Brasil, até o momento estão disponíveis as vacinas bivalente e a quadrivalente. Para meninas e meninos com idade entre 9 e 14 anos, um esquema de duas doses (0 e 5–13 meses) é recomendado. Se a segunda dose de vacina for administrada antes de 5 meses após a primeira dose, um terço da dose é recomendada. Para aqueles com 15 anos ou mais, e para pacientes imunocomprometidos, independentemente da idade, a recomendação é de três doses (0, 1 e 6 meses) (INCA, 2019).

Três grandes estudos randomizados de fase III (FUTURE I, FUTURE II e PATRÍCIA) avaliaram que a vacina profilática tem alta eficácia reduzindo as lesões cervicais de alto risco (Garland *et al.*, 2007; Future II, 2007; Paavonen *et al.* 2007; Paavonen *et al.* 2009). A vacina proporciona elevada proteção contra NIC 3, lesão reconhecidamente precursora do câncer cervical invasivo. Paavonen e co-autores (2007) demonstraram que o risco de câncer invasivo em mulheres com NIC 3 não tratada foi 50 a 100 vezes maior do que o risco das mulheres tratadas e que a proteção da vacina se mostrou eficaz em até nove anos após a vacinação. Recente meta-análise que analisou 7213 pacientes demonstrou eficácia estimada das vacinas contra NIC1, NIC2 e NIC3 de 95% (88-98), 97% (85-99) e 95% (78-99), respectivamente; evidenciando que as vacinas tem um papel de proteção na prevenção dos HPV 6, 11, 16 e 18 (Haghshenas *et al.*, 2017).

Recentemente um estudo de análise retrospectiva, realizado na Escócia, com 140.000 mulheres nascidas de janeiro de 1988 a junho de 1996 que foram vacinadas com a vacina bivalente, demonstrou redução de lesão pré-cancerosa de alto grau em 89% dos casos, quando comparados a mulheres da mesma faixa etária não vacinadas. Este grande impacto na redução das lesões pré-cancerosas corrobora a importância da adoção da vacinação em massa dos adolescentes globalmente e a necessidade de aumentar as

campanhas pró-vacinação contra o HPV (Palmer *et al*, 2019). O impacto da vacinação contra o HPV na Austrália atualizado recentemente, também nos mostra um declínio substancial para lesões associadas ao HPV de alto grau. De um total estimado de 1.544 cânceres associados ao HPV em 2012, 1.242 casos teriam sido evitáveis pela vacina quadrivalente, demonstrando assim o grande impacto da vacinação na população australiana. Os autores ainda estimam que a troca da vacina quadrivalente pela nonavalente ainda possa afetar mais estas taxas no futuro (Patel *et al*, 2018).

3.5 Prevenção secundária do câncer de colo uterino

Tanto a incidência como a mortalidade por câncer do colo do útero podem ser reduzidas com programas organizados de rastreamento. Uma expressiva redução na morbimortalidade pela doença foi alcançada nos países desenvolvidos após a implantação de programas de rastreamento de base populacional a partir de 1950 e 1960 (WHO, 2018).

O rastreamento do câncer do colo do útero se baseia na história natural da doença e no reconhecimento de que o câncer invasivo evolui a partir de lesões precursoras (lesões intraepiteliais escamosas de alto grau e adenocarcinoma *in situ*), que podem ser detectadas e tratadas adequadamente, impedindo a progressão para o câncer (Boda *et al*, 2018).

O método principal e mais amplamente utilizado para rastreamento do câncer do colo do útero é o teste de Papanicolau (exame citopatológico do colo do útero). Segundo a OMS, com uma cobertura da população-alvo de, no mínimo, 80% e a garantia de diagnóstico e tratamento adequados dos casos alterados, é possível reduzir, em média, de 60 a 90% a incidência do câncer cervical invasivo. A experiência de alguns países desenvolvidos mostra que a incidência do câncer do colo do útero foi reduzida em torno de 80%, onde o rastreamento citológico foi implantado com qualidade, cobertura, tratamento e seguimento das mulheres (Saslow *et al*. 2012).

No Brasil, a estratégia de rastreamento preconizada é que as mulheres dos 25 aos 64 anos façam o exame preventivo cada três anos, após dois exames com intervalo de um ano com resultado normal. A priorização desta faixa etária como a população-alvo do Programa justifica-se por ser a de maior ocorrência das lesões de alto grau, passíveis de serem tratadas efetivamente para não evoluírem para o câncer. Segundo a OMS, a incidência deste câncer aumenta nas mulheres entre 30 e 39 anos de idade e atinge seu pico na quinta e sexta décadas de vida. Antes dos 25 anos prevalecem as infecções por HPV e as lesões de baixo grau, que regredirão espontaneamente na maioria dos casos e, portanto, podem ser apenas acompanhadas conforme recomendações clínicas. Após os 65

anos, por outro lado, se a mulher tiver feito os exames preventivos regularmente, com resultados normais, o risco de desenvolvimento do câncer cervical é reduzido dada a sua lenta evolução (WHO, 2018; Boda *et al.*, 2018).

A repetição em um ano após o primeiro teste tem como objetivo reduzir a possibilidade de um resultado falso-negativo na primeira rodada do rastreamento e a periodicidade de três anos tem como base a recomendação da OMS e das diretrizes da maioria dos países com programa de rastreamento organizado (INCA 2019; WHO, 2002; WHO, 2007; Boda *et al.*, 2018).

O rastreamento de mulheres portadoras do vírus HIV ou imunodeprimidas constitui uma situação especial, pois, em função da defesa imunológica reduzida e, conseqüentemente, da maior vulnerabilidade para as lesões precursoras do câncer do colo do útero, o exame deve ser realizado logo após início da atividade sexual, seguido por dois exames consecutivos semestrais e se normais, passam para periodicidade anual (WHO,2018; INCA, 2019).

3.6 Fatores prognósticos e história natural da doença

O principal fator prognóstico em mulheres com câncer de colo do útero é o estágio ao diagnóstico. Quando se comparou doença estágio IA com estágio IVA, a proporção de metástases a distância após o tratamento foi de 3% no estágio IA para 75% nos estádios IVA. Em mulheres com tumores clinicamente restritos ao colo do útero, a invasão angiolinfática, o volume tumoral e a invasão estromal foram os fatores mais associados com invasão linfonodal e sobrevida livre de doença. Em mulheres diagnosticadas em estádios II a IV, as variáveis associadas a pior prognóstico foram o estágio mais avançado, a invasão linfonodal, pélvica ou para aórtica, o maior volume tumoral, a idade avançada e a *performance status* debilitado. O valor prognóstico da invasão linfonodal para-aórtica é essencialmente observado em mulheres com linfonodos pélvicos negativos.

Ainda é controverso, mas muitos estudos apontam que o adenocarcinomas do colo do útero têm um pior prognóstico. Embora nenhum dado seja significativo, o padrão de disseminação dos adenocarcinomas parece diferir dos carcinomas escamosos: os carcinomas escamosos parecem ter uma disseminação eminentemente linfática, enquanto os adenocarcinomas parecem ter uma disseminação hematológica mais frequente. Há maior proporção de metástases ovarianas nos adenocarcinomas, assim como de metástases a distância, com uma maior tendência a apresentar carcinomatose. Além disso, o volume tumoral e a invasão linfonodal, que são fatores prognósticos bem definidos,

tendem a ser maiores e mais frequentes em mulheres com adenocarcinoma quando comparadas com aquelas com carcinoma escamoso. Por estas razões, a sensibilidade à radioterapia dos adenocarcinomas é menor quando comparada à sensibilidade observada para carcinomas escamosos (Koh *et al.*, 2019).

3.7 Diagnóstico do carcinoma invasor

O diagnóstico do câncer do colo do útero é realizado frequentemente pela história e pelo exame físico e sempre é necessária confirmação histológica realizada através da biópsia (Kumar *et al.*, 2007). O carcinoma do colo do útero pode levar a sangramento vaginal anormal, corrimento vaginal, dor pélvica, dispareunia e, em estádios avançados, quando há invasão do paramétrio com compressão dos ureteres, insuficiência renal pós-renal. O diagnóstico e estadiamento do carcinoma de colo uterino são realizados através da anamnese e exame físico geral, exame especular com colposcopia para visualização da lesão e biópsia, toque vaginal para avaliar o volume do colo, fundos de saco e paredes vaginais, toque retal para avaliar as mucosas, o esfíncter anal e os paramétrios. Os exames de imagem (ecografia, tomografia e ressonância magnética) auxiliam a entender a extensão da doença para planejar o melhor tratamento. (Koh *et al.*, 2019).

3.8 Diagnóstico da Infecção pelo vírus HPV

A aplicação de métodos de biologia molecular para a identificação de agentes infecciosos vem apresentando progressiva evolução nos últimos anos, provavelmente correlacionado ao desenvolvimento de novas técnicas de análise do DNA e do RNA. A identificação dos agentes infecciosos é baseada na detecção do DNA ou RNA, que torna possível também a quantificação de micro-organismos num prazo de poucas horas e garante sensibilidade e especificidade elevadas. A tipagem do HPV é realizada por análise do DNA e os método-padrão ouro pela elevada sensibilidade e especificidade é através da amplificação do material nucleico por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) (Snijders *et al.*, 1990; Smits *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2018).

A técnica de PCR foi desenvolvida por Mullins (1983) e provocou grande impacto, pois a sua grande sensibilidade permite a amplificação a partir de amostras muito escassas de DNA ou RNA. Os avanços da técnica permitem a detecção de amplificação do DNA ou cDNA em tempo real (*real time*) que permite a detecção do HPV sem a necessidade de eletroforese ou hibridizações posteriores à PCR. A análise de positividade ou negatividade se faz pela análise, em tempo real, na tela do computador. De fato, a

referida técnica se baseia na emissão luminosa que ocorre dentro dos poços de reação graças a reagentes químicos que emitem luz na medida em que ocorre amplificação específica do DNA de HPV (Snijders *et al.*, 1990; Smits *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2018).

3.9 Estadiamento do câncer cervical

O câncer do colo do útero se dissemina por extensão direta para o paramétrio, vagina, útero e órgãos adjacentes, isto é, bexiga e reto. A disseminação também ocorre através da via linfática até os linfonodos regionais, ou seja, obturador, ilíaca externa e ilíaca interna, e daí para os linfonodos ilíacos e para-aórticos. Metástase à distância aos pulmões, fígado e esqueleto pela via hematogênica é um fenômeno tardio, usualmente (Pecorelli *et al.*, 2009).

Um sistema de estadiamento é a maneira simplificada para que todos os membros de uma equipe multidisciplinar entendam de imediato a extensão da doença. O sistema mais utilizados para o estadiamento do câncer do colo de útero é o sistema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) que era baseado principalmente nos resultados do exame clínico e em alguns exames, como cistoscopia e proctoscopia. A versão de FIGO utilizada para este trabalho foi a de 2009, que era a mais amplamente usada na ocasião da escrita do projeto inicial deste trabalho (**Tabela 2, Figura 4**). Basicamente, divide o estadiamento em: Estágio I – tumor limitado ao colo uterino; Estágio II – tumor que invade vagina e/ou paramétrios proximais; Estágio III – tumor que invade a vagina e/ou paramétrios distais, e Estágio IV – tumor que invade estruturas extra uterinas.

Tabela 2 – Estadiamento do câncer de colo uterino – FIGO 2009.

Estágio Clínico FIGO

Estágio I - Tumor limitado ao colo uterino

Ia1: Tumor com infiltração estromal de até 3 mm de profundidade, não estendendo mais que 7 mm lateralmente.

Ia2: Tumor com infiltração estromal de 3 a 5 mm de profundidade, não estendendo mais que 7 mm lateralmente.

Ib1: Tumor confinado ao colo uterino, medindo entre 5 mm e 4 cm.

Ib2: Tumor confinado ao colo uterino medindo mais de 4 cm.

Estágio II - Tumor se estende além do colo uterino, mas não atinge a parede pélvica nem o terço inferior da vagina.

IIa1: Tumor com infiltração do terço superior da vagina, medindo até 4 cm.

IIa2: Tumor com infiltração do terço superior da vagina, medindo mais de 4 cm.

IIb: Tumor com infiltração parcial do paramétrio.

Estágio III - Tumor se estende além do colo uterino, e atinge a parede pélvica nem o terço inferior da vagina.

IIIa: Tumor com infiltração até o terço inferior da vagina

IIIb: Tumor com infiltração do paramétrio até o plano ósseo, ou com exclusão renal.

Estágio IV - Invasão de estruturas adjacentes ou metástase à distância.

IVa: Infiltração da bexiga ou do reto.

IVb: Metástases a distância.

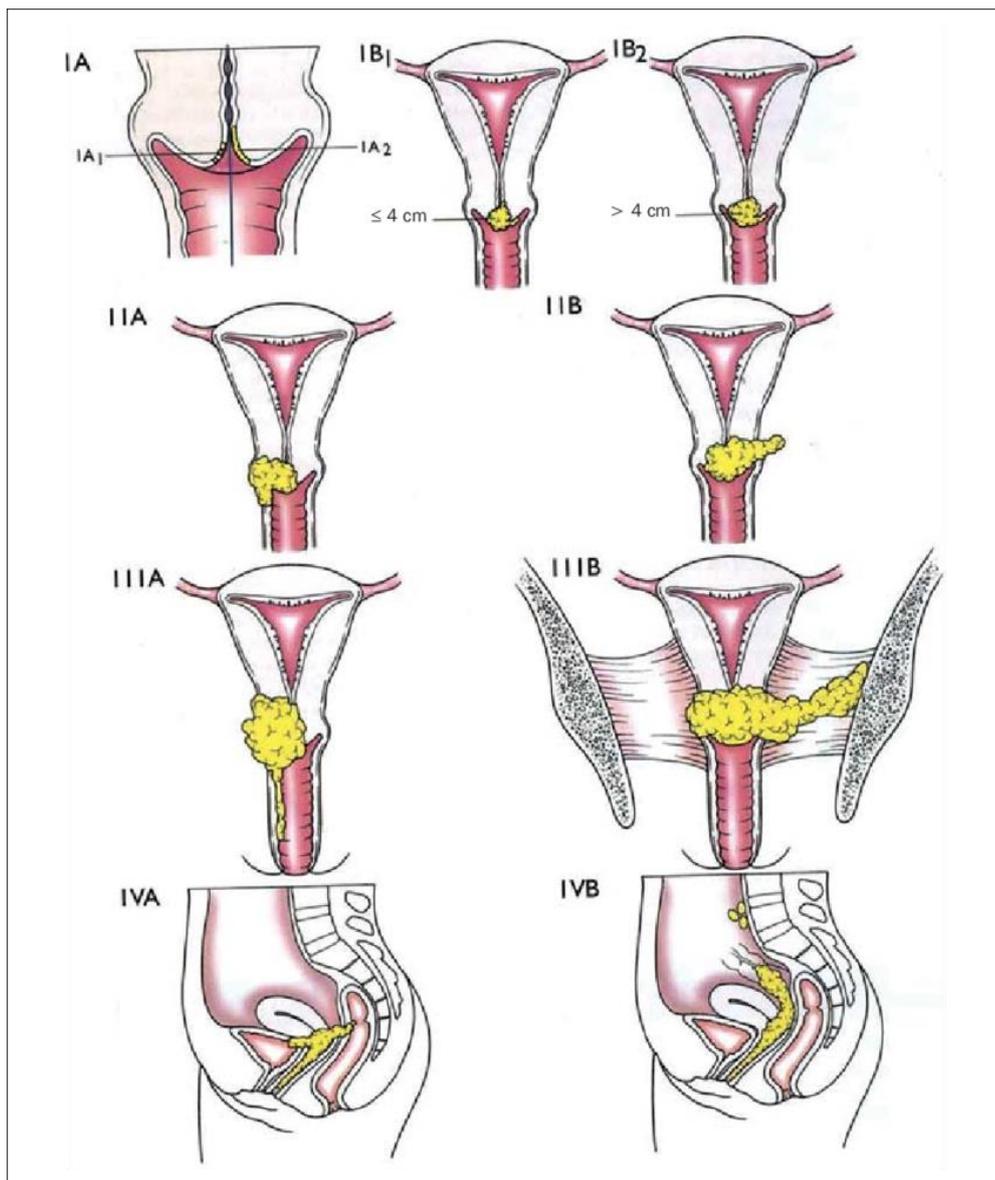


Figura 4 – Representação do estadiamento do câncer de colo uterino – FIGO 2009.

Recentemente, em 2018, o estadiamento da FIGO foi revisado e refere que exames adicionais de imagem seriam necessários e podem ser empregados, surgindo uma nova subdivisão do estágio III – a categorização do EC IIIC –que é o envolvimento de linfonodos pélvicos e para-aórticos independentes do tamanho do tumor (Bhatla *et al.*, 2018).

Os métodos de imagem como a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM) e a *Positron Emission Tomography* (PET) associada à TC (PET-CT) apresentam desempenho superior ao exame físico no estadiamento do câncer do colo do útero. Porém, estes exames aumentam os custos relacionados ao tratamento do câncer

tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Tendo em vista que cerca de 80% dos carcinomas de colo do útero ocorrem em países em desenvolvimento, que não têm TC, RM ou PET-CT disponíveis para a maioria das mulheres, a FIGO restringiu a propedêutica para exame clínico e Raios X contrastados como urografia excretora e enema baritado (Bhatla *et al.*, 2018).

3.10 Sobrevida do câncer de colo uterino

As taxas de sobrevida abaixo são da 7ª edição do sistema de estadiamento da AJCC, publicadas em 2010, a partir de dados coletados no banco de dados do Instituto de Câncer Americano e estão baseadas em pacientes diagnosticadas entre 2000 e 2002. Os dados abaixo na **Tabela 3** eram os mais recentes disponíveis pelo sistema de estadiamento utilizado até então (AJCC, 2010).

Tabela 3 - Estimativa de sobrevida em 5 anos de acordo com estágio clínico.

Estágio IA	93%
Estágio IB	80%
Estágio IIA	63%
Estágio IIB	58%
Estágio IIIA	35%
Estágio IIIB	32%
Estágio IVA	16%
Estágio IVB	15%

3.11 Tratamento do câncer cervical

O estadiamento do câncer de colo do útero é o fator mais importante na escolha de tratamento. No entanto, outros fatores que podem influenciar nessa decisão incluem a localização exata do tumor, o tipo de doença (células escamosas ou adenocarcinoma), idade da paciente, condição física geral e se a paciente deseja ter filhos. De forma geral, nos casos iniciais (até EC IB1), o tratamento curativo é cirurgia seguida ou não de radioterapia e/ou braquiterapia complementar (Koh *et al.*, 2019).

Na doença localmente avançada – EC IB2, EC IIA, IIB, IIIA e IVA – o tratamento de eleição é a combinação de quimioterapia (cisplatina semanal) concomitante à radioterapia e braquiterapia em casos selecionados. Se a paciente não puder receber

tratamento concomitante, o tratamento indicado é a radioterapia exclusiva (Koh *et al.*, 2019).

Já no estágio IVB, sob cenário de doença metastática e incurável; a quimioterapia, radioterapia e cirurgia são consideradas paliativas e devem ser indicadas de acordo com cada caso. As opções de tratamento incluem radioterapia para aliviar os sintomas da doença. Os esquemas de quimioterapia administrados utilizam um composto de platina junto com outro medicamento, como o paclitaxel, a gemcitabina ou o topotecano (Koh *et al.*, 2019). A terapia alvo com bevacizumab que é um anticorpo monoclonal anti-VEGF (vascular endotelial grow-factor) pode ser administrada junto com a quimioterapia em primeira linha paliativa e foi a única droga inovadora que demonstrou benefício real nesta população de pacientes, aumentando a sobrevida global de 13,3 para 17 meses (HR, 0,71; 98% IC 0,54 – 0,95; p=0,004) e aumentando as taxas de resposta (48% vs. 36%, p=0,008) (Tewari *et al.*, 2014).

Recentemente, ensaios clínicos estão testando outras combinações de medicamentos no tratamento do câncer de colo uterino, bem como alguns outros tratamentos experimentais sem resultados impressionantes até o momento. Contudo, com toda a evolução da oncologia nos últimos anos, muito pouco avançamos e pouco foi descoberto sobre a heterogeneidade da patogênese desta doença nas diferentes populações de pacientes (Koh *et al.*, 2019).

3.12 Alterações genéticas no câncer de colo uterino

A carcinogênese é um processo complexo que envolve alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em diversos processos relacionados, envolvendo o controle do ciclo celular, a apoptose, a diferenciação, a senescência e a angiogênese, além da motilidade celular e capacidade migratória. Várias são as teorias do processo carcinogênico e a mais difundida é a teoria da mutação somática que se refere a um grupo de células que sofre mutações genéticas, tornando-se potencialmente capazes de se multiplicarem de modo autônomo, escapando de todos os mecanismos de proteção do DNA. A partir daí, ocorre a expansão clonal dessas células, a qual leva a um grande acúmulo de mutações genéticas e a transformação em neoplasias (Karakas *et al.*, 2006; Samuels and Waldman, 2010; Ojesina *et al.*, 2014). Estudos recentes demonstraram que vários fatores desempenham um papel importante na carcinogênese do câncer cervical, como alterações no número de cópias, perda de heterozigose, inativação do gene supressor (por exemplo, o TP53 e o PTEN) ou ativação do oncogene (por exemplo, o

RAS, o PI3K e o EGFR). Essas alterações genéticas são complexas e, na maioria das vezes, estão correlacionadas (Karakas *et al.*, 2006; Samuels and Waldman, 2010; Ojesina *et al.*, 2014).

Análises moleculares de células malignas em vários estágios de progressão têm revelado alterações nos genes supressores tumorais e nos oncogenes acumuladas durante a progressão tumoral e relacionadas com a agressividade do câncer (Yokota, 2000; Lee and Muller, 2010; Ojesina *et al.*, 2014). Genes supressores tumorais e seus produtos proteicos agem na regulação do ciclo celular, especificamente nos pontos de checagem (*check points*), prevenindo duplicações celulares aberrantes e, conseqüentemente, atuando como fatores antitumorais (Lee and Muller, 2010; Ojesina *et al.*, 2014). Alterações no padrão de expressão desses genes acarretam na ineficiência ou ausência da checagem do ciclo celular e, dessa maneira, permitem erros de replicação alélica, determinando ou potencializando os eventos da carcinogênese (Lee and Muller, 2010). A mutação em PI3K é reportada como a mais frequente alteração genética em câncer cervical, seguida por KRAS, EGFR e PTEN (Karakas *et al.*, 2006; Samuels and Waldman, 2010; Ojesina *et al.*, 2014).

3.13 Via de sinalização da PI3K/AKT/mTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR está frequentemente alterada em diversas neoplasias malignas, estando intimamente relacionada com metástase, angiogênese, crescimento tumoral e resistência aos tratamentos. Essa via de sinalização é crucial em muitos aspectos do crescimento e sobrevivência celular, tanto em condições fisiológicas como patológicas (Janku *et al.*, 2018; Polivka and Janku, 2014; Martini *et al.*, 2014; Carnero and Paramio, 2014; Karakas *et al.*, 2006; Fresno Vara *et al.*, 2004; Chaves, 2017).

Trata-se de uma via complexa que têm um papel central e que interage com outras vias, sendo ativada por meio da ligação de fatores de crescimento que se ligam à membrana plasmática celular por meio de receptores tirosina-quinase também presentes na membrana da célula. Essa ligação provoca uma cascata de sinalização intracelular que começa com a ativação da molécula PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*) que, através de seu subproduto PIP3, ativa AKT. Uma vez fosforilada, AKT pode ativar mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), que regula a proliferação celular por fosforilação de P70S6 na transição da fase G1/S do ciclo celular. P70S6, por sua vez, fosforila a proteína S6 da subunidade 40S do ribossomo (PS6), induzindo a síntese proteica celular.

Esta reação é regulada negativamente pela desfosforilação do PTEN. A perda de PTEN culmina com a estimulação da via PI3K, promovendo, assim, a sobrevivência da célula e o crescimento tumoral. Quando o PTEN é deletado, ou está mutado ou ainda inativado, há um aumento na regulação de AKT por meio de efetores PI3K. Essa sobre-regulação finalmente reduz a indução apoptótica, levando à continuada sobrevivência e proliferação celular, contribuindo para a carcinogênese. A rede de sinalização PI3K/PTEN é fundamental para uma adequada regulação da sobrevivência celular (Janku *et al.*, 2018; Polivka and Janku, 2014; Martini *et al.*, 2014; Carnero and Paramio, 2014; Karakas *et al.*, 2006; Fresno Vara *et al.*, 2004; Chaves, 2017).

3.13.1 PI3k estrutura e função

A proteína PI3K pertence à família de lipídios-quinases presentes no meio intracelular e são divididos em 3 classes (Classe I, Classe II e Classe III), de acordo com sua estrutura, distribuição tecidual, mecanismos de ativação, função e substratos lipídicos. A classe I da PI3K é constituída por heterodímeros compostos de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade adaptadora/reguladora (p85). Existem ainda as isoformas da classe I de PI3K, que são compostas de isoformas de p110 (p110 α , p110 β e p110 δ , codificadas respectivamente pelos genes PI3KA, PIK3CB e PIK3CD) e isoformas de p85 (p50 α , p55 γ , p85 α , p85 β , codificado pelos genes PIK3R, PIK3R2 e PIK3R3) (**Figura 5**). A ligação da subunidade p85 com a subunidade 110 promove sua estabilização. (Gonçalves *et al.*, 2018; Janku *et al.*, 2018; Polivka and Janku, 2014; Martini *et al.*, 2014; Carnero and Paramio, 2014; Fresno Vara *et al.*, 2004; Chaves, 2017).

Em mamíferos, a Classe I das PI3Ks é dividida em dois grupos, Classe IA e Classe IB, com base em diferenças estruturais e funcionais. A subclasse IA é ativada por receptores tirosina-quinases como EGFR, FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) e IGF-1R (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*). A subclasse IB é ativada por receptores acoplados à proteína G (**Figura 5**). Todas as subunidades catalíticas da Classe I de PI3K contém domínios de ligação para Ras GTPases e a ligação desses domínios a certas proteínas RAS contribui para a sua ativação (Gonçalves *et al.*, 2018; Janku *et al.*, 2018; Polivka and Janku, 2014; Martini *et al.*, 2014; Carnero and Paramio, 2014).

A via PI3K tem início quando suas classes são ativadas. A classe IA torna-se ativa quando há a ligação de um ligante a um receptor na membrana plasmática da célula e essa

ação promoverá a dimerização do receptor e a auto fosforilação de tirosinas (Y). Uma vez ativados, os subprodutos da classe IA de PI3K irão fosforilar primariamente PIP2 (*phosphatidylinositol-4,4-biphosphate*) gerando o produto PIP3 (**Figura 6**). A geração de PIP3 leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras e efetoras dentre as quais o AKT/PKB. A via PI3K possui ainda diversas outras repercussões nas células por meio da ativação de AKT, a qual regula uma série de processos envolvidos na sobrevivência da célula e na progressão do ciclo celular (Gonçalves *et al.*, 2018; Janku *et al.*, 2018; Polivka and Janku, 2014; Martini *et al.*, 2014; Carnero and Paramio, 2014; Fresno Vara *et al.*, 2004; Chaves, 2017).

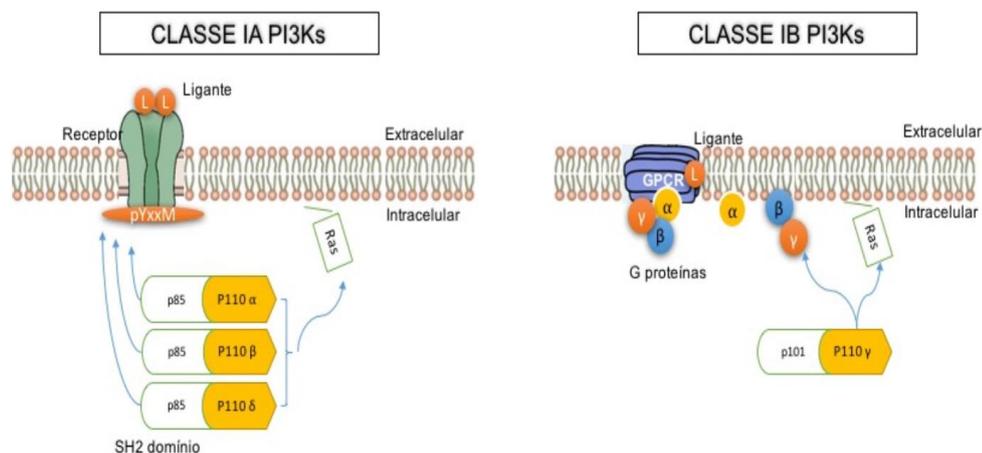


Figura 5 – Estrutura molecular e mecanismo de ativação da PI3K e suas subunidades. A classe I é subdividida em grupo A e B. O subgrupo IA é ativado por receptores tirosina-quinase e o subgrupo IB é ativado por receptores acoplados à proteína G. Fonte: Chaves, 2017.

3.13.2 AKT estrutura e função

AKT é também conhecida como proteína quinase B, por manter algumas similaridades, em seu domínio catalítico, com as proteínas quinases A (PKA) e C (PKC). Foram isolados 3 membros dessa família (AKT1, AKT2 e AKT3) que são codificados por diferentes genes, possuindo mais de 80% de semelhança entre as suas cadeias de aminoácidos. A ativação de AKT1 parece ser predominante em diferentes tipos de neoplasias. Quando receptores de fatores de crescimento são estimulados, a via PI3K é ativada, gerando a produção de PIP3 na membrana plasmática, o qual desencadeia a

translocação de AKT do citoplasma para a membrana e se liga com o domínio PH de AKT. Fisiologicamente, AKT controla diversas funções celulares, como crescimento, sobrevivência, proliferação e metabolismo: AKT1 possui papel crítico na sobrevivência celular, AKT2 exerce ação central na manutenção da homeostase da glicose e AKT3 atua no desenvolvimento do cérebro. No câncer, AKT encontra-se superativado e os mecanismos que levam à hiperativação de AKT, são eles: mutações em seus reguladores PI3K e PTEN, superexpressão do gene AKT/PKB ou deleção ou regulação negativa (PTEN) (Martini *et al.*, 2014; Fresno Vara *et al.*, 2004; Chaves, 2017).

3.13.3 PTEN estrutura e função

PTEN é um dos principais genes responsáveis pela progressão de várias neoplasias, e age como antagonista ao PI3K devido a desfosforilação de PIP3 a PIP2. A mutação, hipermetilação e/ou silenciamento por microRNAs podem diminuir a expressão desse gene e contribuir para hiperativação da via PI3K/AKT nas neoplasias. O gene PTEN, também conhecido por MMAC1 (*Mutated in Multiple Advanced Cancer 1*) e TEP1 (*Telomerase Protein Component 1*) codifica uma proteína composta por 403 aminoácidos que contém um domínio fosfatase N-terminal, um domínio C2 e uma região caudal C-terminal que contém múltiplos sítios de fosforilação. celular (Janku *et al.*, 2018; Polivka and Janku, 2014; Martini *et al.*, 2014; Carnero and Paramio, 2014; Chalhoub and Baker, 2009; Fresno Vara *et al.*, 2004; Chaves, 2017).

O PTEN foi isolado e identificado inicialmente como um gene supressor tumoral em neoplasias de mama e em glioblastomas, apresentando-se mutado e com sua expressão alterada em neoplasias malignas tanto em origem hereditária como casos espontâneos em variados tipos de câncer. O principal substrato *in vivo* do PTEN é o PIP3, um produto direto da atividade PI3K. A ativação de PI3K por sinalizações dependentes dos fatores de crescimento leva à síntese de PIP3, que é desfosforilado por PTEN a PIP2. A presença do PTEN, portanto, mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto que sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização PI3K/AKT (**Figura 6**) (Janku *et al.*, 2018; Polivka and Janku, 2014; Martini *et al.*, 2014; Carnero and Paramio, 2014; Chalhoub and Baker, 2009; Chaves, 2017).

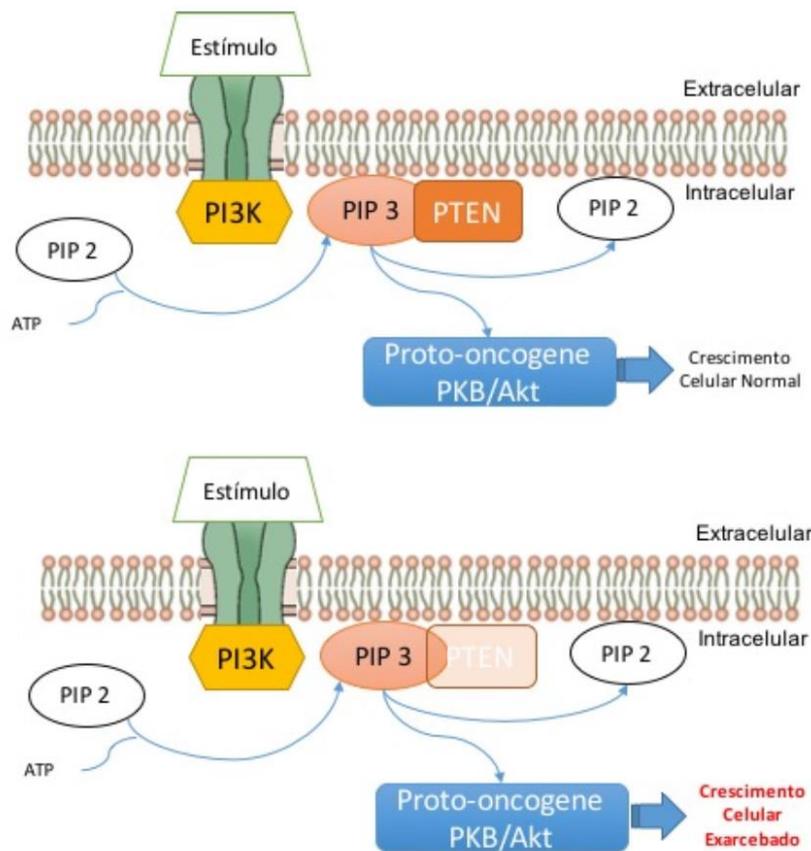


Figura 6 - Representação esquemática do papel de *PTEN* como regulador da via PI3K. A ativação de PI3K leva à síntese de PIP3, que é desfosforilado a PIP2. A presença do PTEN mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto que sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização PI3K/AKT. *Fonte: Chaves, 2017.*

3.13.4 Mutação do PI3K e neoplasias malignas

O PI3K é um dos oncogenes mais comumente mutados no câncer e as mutações frequentemente se agrupam em dois pontos críticos. Até o momento, o câncer de mama, endométrio e cólon são os tumores com maior frequência de mutações em PI3K (Karakas *et al.*, 2006). Há algum inconsistência na literatura quanto à frequência de mutações no gene PI3K nas diferentes neoplasias; no entanto, essas discrepâncias provavelmente são devidas a vários fatores, incluindo exons específicos sequenciados, variação geográfica, interferência na fase pré-analítica, entre outras causas (Karakas *et al.*, 2006; Janku *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2018). No entanto, apesar dessas discrepâncias, a alta frequência mutação de PI3K e a descoberta de mutações no *hot-spot* têm importantes implicações para o diagnóstico, prognóstico e novos horizontes para o tratamento do câncer.

3.13.5 Mutações em PI3K

Três mutações *hot-spot* foram descobertas dentro de dois exons (Exon 9: E542K e E545K e Exon 20: H1047R) e são responsáveis por 80-90% de todas as mutações de PIK3CA em neoplasias malignas (**Figura 7**) (Jelovac *et al.*, 2014; Gustin *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2015). O câncer de pulmão contém uma gama mais ampla de mutações PI3K com mutações E545K Exon 9 representando a maioria, em aproximadamente 30% de frequência (Jelovac *et al.*, 2014). Embora o significado prognóstico das mutações PI3K permaneça controverso, as mutações do hotspot mostraram ter características oncogênicas distintas e resistência a algumas quimioterapias (Jelovac *et al.*, 2014; Gustin *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2015).

Os escassos estudos disponíveis na literatura sobre mutações em PI3K no câncer cervical também exploraram os hot-spot mais frequentes e identificaram maior frequência de mutações no Exon 9: E542K e E545K (Jelovac *et al.*, 2014; Gustin *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2015).

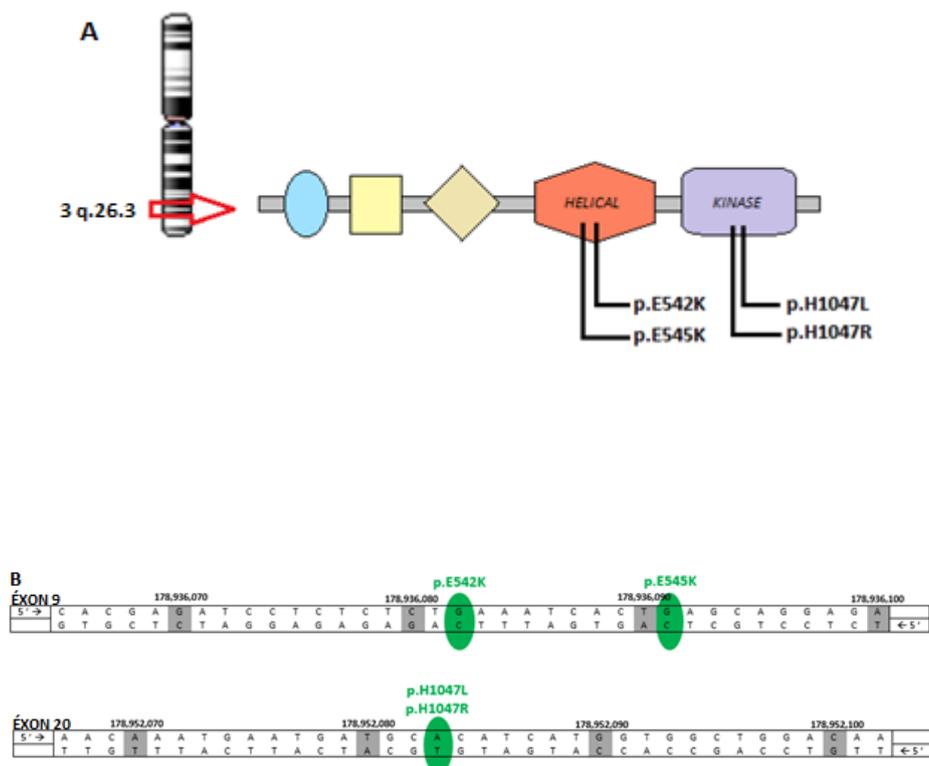


Figura 7: Hot-spot de mutação em PI3K. (A) Localização do gene PI3K no cromossomo 3 e a distribuição das mutações somáticas nos domínios helical e quinase; (B) Localização dos pontos de mutação nos hotspots dos éxons 9 e 20.

3.13.6 Inibidores de PI3K – Alpelisib

As mutações no gene PI3K ocorrem em até 40% dos tumores de mama com receptores hormonais positivos, possuindo um papel de importância no mecanismo de resistência a terapia endócrina no câncer de mama. Diante desse cenário, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou em 23 de maio de 2019 o tratamento do câncer de mama metastático/localmente avançado receptor hormonal positivo com o inibidor de PI3K alpelisib em pacientes com mutação do PI3K após progressão a terapia hormonal. O Alpelisib é um inibidor via oral do PI3K alfa-específico, que é a isoforma que sofre mutação em câncer de mama (André *et al.*, 2019; Massacesi *et al.*, 2016).

Essa terapia foi avaliada no estudo de fase III SOLAR-1, que randomizou 572 pacientes com câncer de mama metastático RH positivo HER-2 negativo com progressão a terapia endócrina com inibidor da aromatase para receberem fulvestranto associado

a Alpelisib ou a placebo. Foi permitida a inclusão de pacientes com resistência primária a terapia hormonal (recorrência em menos de 24 meses do início de terapia hormonal adjuvante, ou progressão em menos de 6 meses do início da terapia hormonal de primeira linha), bem como aqueles com resistência secundária (recorrência após mais de 24 meses do início de terapia hormonal adjuvante, recorrência em menos de 12 meses após o fim da terapia hormonal adjuvante, ou progressão após mais de 6 meses do início de terapia hormonal de primeira linha). A análise dos resultados na população com mutação de PI3K, após um seguimento mediano de 20 meses, demonstrou benefício em sobrevida livre de progressão (HR=0,65; IC de 95%: 0,50-0,85; p<0,001), com uma redução do risco para progressão de doença da ordem de 35%, além de maior taxa de resposta (26,6% *versus* 12,8%) para os pacientes tratados com Alpelisib. Os dados de sobrevida global ainda não são maduros nesta análise. O tratamento com Alpelisib na coorte de pacientes com ausência de mutação do PI3K não foi capaz de demonstrar benefício em sobrevida livre de progressão (André *et al.*, 2019).

A consulta ao banco de dados Internacional de estudos clínicos nos mostra que até o momento está sendo realizado 47 estudos clínicos com alpelisib nas diferentes neoplasias e outros 179 estudos com outros Inibidores PI3K. Este dado corrobora a importância de estudar a mutação do PI3K e entender esta via de sinalização, crucial na busca do tratamento para o câncer (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=alpelisib&humancancer=03/07/2019>).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Quadro amostral e parâmetros clínicos

Foi conduzida busca retrospectiva de todos os casos de neoplasia de cérvix uterina no banco de dados da Unidade de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Geral de Caxias do Sul, 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), desfecho de resposta ao tratamento realizado (resposta completa, resposta parcial, doença estável ou progressão de doença), data da progressão de doença (quando pertinente), data do óbito (quando pertinente) e data do último seguimento.

Os seguintes dados foram previamente definidos:

- 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 seguimento;
- c) Sobrevida global: tempo entre a data do diagnóstico até a data do registro de óbito e/ou data do último seguimento.

As lâminas originais coradas em hematoxilina e eosina foram independentemente revisadas por três patologistas para confirmação diagnóstica e após foi procedida a análise molecular.

4.2 Análise Molecular

4.2.1 Extração de material genético

As amostras viáveis foram obtidas a partir de biópsia inserida em formol tamponado no momento da coleta e incluído em parafina e após foram submetidas à revisão patológica. Foi realizado um corte de aproximadamente 35mg no bloco, este foi submetido à desparafinização, à digestão proteica e realizada a extração de DNA. O material genético (DNA) foi extraído com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* da Promega, utilizando-se as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado por meio do *Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Fisher Scientific)*, sendo necessário 20ng/μL para a análise.

4.2.2 Detecção das mutações no gene PI3K

Três *hot-spots* em *PI3K* foram analisados: dois no éxon 9 e um no éxon 20. A detecção das mutações foi realizada com o equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* utilizando *TaqMan® Genotyping Master Mix*, *primers* e sondas *TaqMan®*, todos da *Applied Biosystems (Foster City, CA)*, seguindo as recomendações do fabricante. Para a avaliação da presença de mutação foi utilizada uma sonda *TaqMan* de referência, seguidas de análise no programa *7500 Software v2.0.6 (Thermo Fisher Scientific)*. Dentre as mutações avaliadas estão listadas p.E542K, p.E545K, p.H1047R e p.H1047L (**Tabela 4**).

Tabela 4. Mutações em PI3K avaliadas.

Mutação	Éxon	Mudança de nitrogenada	Base	Mudança de Amino-Ácido
p.E542K	9	c.1624G>A		Glu→Lis
p.E545K	9	c.1633G>A		Glu→Lis
p.H1047R	20	c.3140A>G		His→Arg
p.H1047L	20	c.3140A>T		His→Leu

4.2.3 Detecção da presença do papilomavírus (HPV)

A detecção dos HPV's 16 e 18 foi realizada com o equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* utilizando *TaqMan® Genotyping Master Mix*, *primers* e sondas *TaqMan®*, todos da *Applied Biosystems (Foster City, CA)*, seguindo as recomendações do fabricante. As sondas foram sintetizadas, segundo Lindh *et al.* (2007), descritas na **Tabela 5** abaixo:

Tabela 5 - Iniciadores e sondas utilizados.

Tipo	Oligonucleotídeo	Sequência
16	F	TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGA
	R	CAGTAGAGATCAGTTGTCTCTGGTTGC
	P	AATCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGA
18	F	AGAGGCCAGTGCCATTCGT
	R	GTTTCTCTGCGTCGTTGGAGT
	P	TCCTGTCGTGCTCGGTTGCAGC

4.3 Aspectos Éticos

Todos os pesquisadores assinaram o termo de sigilo e confidencialidade, após devida aprovação pelo Conselho Científico e Editorial do Hospital Geral (COEDI) 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 guiar publicações neste campo. Os pesquisadores não possuem conflito de interesse a serem declarados para esta pesquisa e todo o custeio foi financiado pela própria equipe de pesquisa.

4.4 Aspectos Estatísticos

Frequências absoluta e relativa foram utilizadas para análise estatística descritiva das variáveis. Os testes exato de Fisher e χ^2 bicaudal foram utilizados quando apropriados. Taxas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e analisadas pelo teste de log-rank. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do *Statistical Package for the Social Sciences Software Package* (SPSS) versão 22.0.

5. RESULTADOS

Foram detectadas 130 pacientes portadoras de câncer cervical tratadas no Hospital Geral no período delimitado pelo estudo. Cinquenta e sete pacientes desta amostra não dispunham de material histológico disponível na Unidade de Patologia da instituição e não foi possível resgatá-los principalmente por tratarem-se de diagnóstico realizado em outros municípios. 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. Dos 59 casos, apenas uma amostra não foi possível realizar extração de DNA por material insuficiente. O diagrama de fluxo da coorte em estudo encontra-se na **Figura 8**.

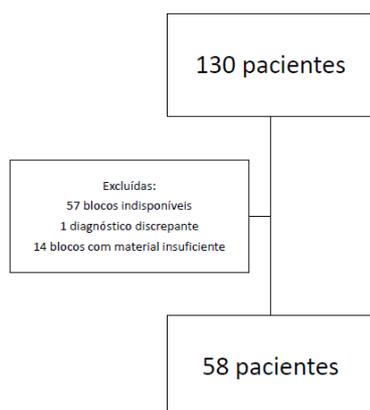


Figura 8. Fluxograma de recrutamento da coorte.

As características clínico-patológicas encontram-se agrupadas na **Tabela 6**. A mediana de idade observada foi de 44 anos (mínima de 21 anos e máxima de 68 anos), 29,3% apresentou história de tabagismo. Carcinoma escamoso foi o tipo histológico preponderantemente diagnosticado (88% , n=51), seguido pelo adenocarcinoma (n=7). Ao diagnóstico, 27,6% (n=16) portava PS 0, enquanto 64% (n=37) portava PS 1; três pacientes apresentavam PS 2, e duas pacientes, PS 3. Seis pacientes (10,3%) encontravam-se em EC IB, 5 pacientes (8,6%) em EC IIA, 2 pacientes (3,4) em EC IIB,

13 pacientes (22,4%) em EC IIIA, 4 pacientes (6,9%) em ECIIIB, 25 pacientes (43,1%) em EC IVA e 3 pacientes (5,2%), em EC IVB.

Tabela 6 : Características clínico-patológicas das pacientes.

Variáveis	Número de pacientes	%
Idade (anos)	58	100
Mediana idade 44		
Idade mínima: 21		
Idade máxima: 68		
Tabagismo sim	17	29,3
não	41	70,7
Subtipo Histológico		
Carcinoma epidermóide	51	88
Adenocarcinoma	7	12
WHO performance status		
0	16	27,6
1	37	64
2	3	5,2
3	2	3,4
Estágio Clínico – FIGO 2009		
IB	6	10,3
IIA	5	8,6
IIB	2	3,4
IIIA	13	22,4
IIIB	4	6,9
IVA	25	43,1
IVB	3	5,2

Abreviações: WHO - World Health Organization, FIGO (2009).

Como tratamento, cirurgia primária foi indicada para 19% (n=11) das pacientes, enquanto 63,4% (n=37) receberam quimiorradiação como tratamento definitivo e 19 (32,8%) pacientes foram submetidas à braquiterapia complementar. Dez pacientes receberam radioterapia exclusiva (17,2%).

Até a data da conclusão desta análise, 50% das pacientes (n=29) apresentaram progressão de doença e ocorreram 38% de óbitos (n=22) relacionados à neoplasia. Com uma mediana de seguimento de 22,8 meses, a sobrevida livre de progressão em 1 ano foi de 66% e a estimativa em 3 anos foi de 44,8%, respectivamente (**Figura 9**). A sobrevida global em 1 ano foi de 79,2% e a estimativa em 3 anos foi de 63,4%, respectivamente (**Figura 10**).

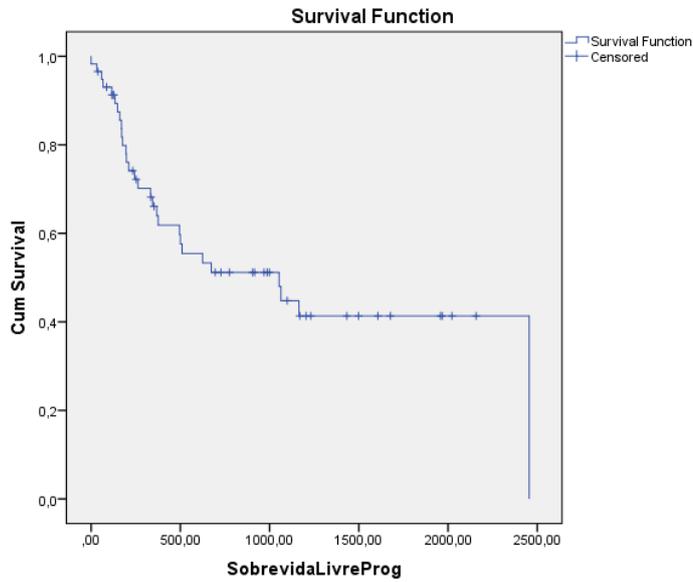


Figura 9 – Estimativa de Sobrevida Livre de Progressão nas pacientes com neoplasia cervical – Kaplan-Meier.

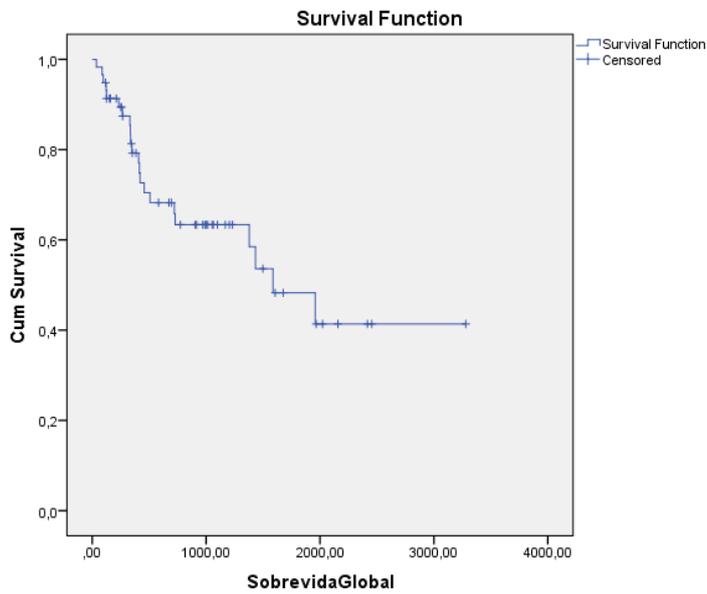


Figura 10 – Estimativa de Sobrevida Global nas pacientes com neoplasia cervical–Kaplan Meier.

Em relação a presença de HPV nas pacientes avaliadas, um resumo dos dados podem ser visualizados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Status do genótipo de HPV 16/18 da população avaliada.

Genótipo do HPV	N de pacientes	% da amostra
HPV 16	28	48,3%
HPV 18	10	24,1%
HPV 16/HPV 18	2	3,4%

40 (69%) apresentaram positividade para HPV16/HPV18, sendo 28 pacientes (48,3%) positividade para HPV16, 14 pacientes (24,1%) positividade para HPV 18 e duas pacientes (3,4%) tiveram positividade para ambos genótipos. Analisando o genótipo de HPV com as características clínico-patológicas das pacientes (idade, tabagismo, PS, subtipo histológico, EC, modalidade de tratamento realizado e desfecho de resposta), não foi observado relação estatística significativa. A análise de sobrevida global também não apresentou diferença na população estudada quando relacionado com o genótipo de HPV 16 ($p=0,550$) e 18 ($p=0,594$), respectivamente.

A presença de mutação em PI3K foi avaliada e os dados estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Status das mutações em PI3K da população avaliada.

Mutação	Éxon	No de mutações encontradas	% da amostra N=58
p.E542K	9	2	3,4%
p.E545K	9	12	20,7%
p.H1047R	20	5	8,6%
p.H1047L	20	2	3,4%

Dos 58 casos analisados, 17 casos (29,3%) apresentaram mutação em PI3K. Em relação às mutações avaliadas, a mais frequente foi a p.E545K (éxon 9), encontrada em 12 pacientes (20,7%). Em segundo lugar, aparece a mutação p.H1047R (éxon 20), presente em cinco pacientes (8,6%), seguida da mutação p.E542K (éxon 9) presente em duas pacientes (3,4%) e da mutação p.H1047 também presente em duas pacientes avaliadas (3,4%). Três pacientes (5,2%) apresentaram mais de uma das mutações avaliadas.

Analisando a presença de mutação em PI3K com as características clínico-patológicas das pacientes, não observamos correlação estatística significativa. À análise de sobrevida global também não diferiu na população estudada correlacionando o status da mutação em PI3KCA ($p=0,487$) (**Figura 11**).

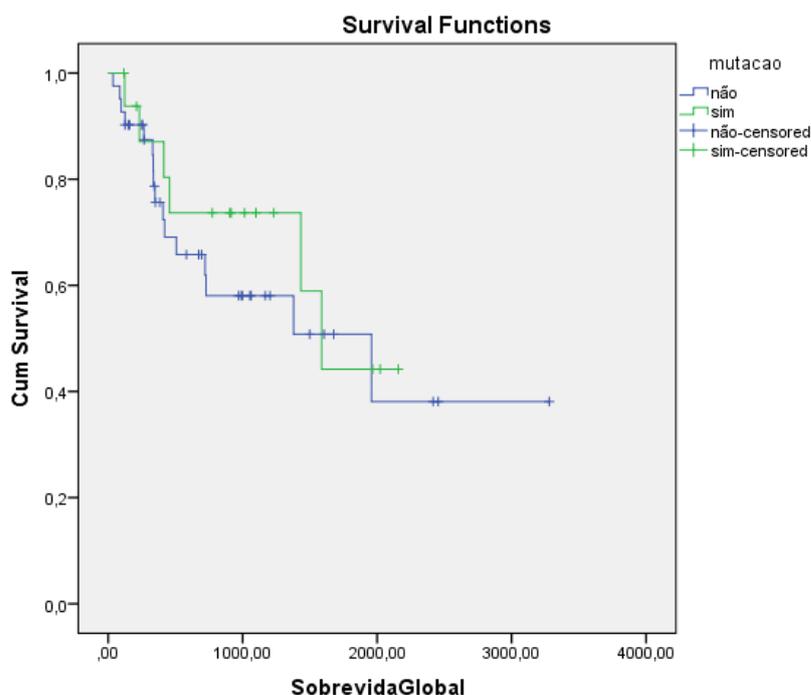


Figura 11 - Curvas de Kaplan-Meier e teste de log-rank segundo análise de sobrevida global de pacientes com neoplasia cervical, baseada no status da presença de mutação em PI3K.

6. DISCUSSÃO

As neoplasias estão entre as principais causas de mortes mundiais, sendo que para as mulheres, o câncer cervical ocupa posição de destaque em incidência e mortalidade no países em desenvolvimento (WHO, 2018). Embora as taxas de incidência e mortalidade sejam alarmantes, não podemos esquecer que trata-se de uma doença evitável e curável se diagnosticada oportunamente (Brinton *et al*, 2002; Bruni *et al*, 2010; Ghittoni *et al*, 2015; Boda *et al*, 2018). Levando em conta o histórico dos fatores de risco do câncer cervical, há uma lacuna do conhecimento acerca da patogênese, do desenvolvimento e da evolução da neoplasia que não estão ainda bem elucidadas. Os HPVs são vírus epiteliotróficos e já está bem estabelecido que os genótipos de alto risco podem levar ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, cujas mais comuns são a neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), intra-epitelial vulvar (NIV), neoplasia intraepitelial peniana (NIP), neoplasia intra-epitelial anal e carcinoma espinocelular (Brinton *et al*, 2002; Bruni *et al*, 2010; Ghittoni *et al*, 2015; Boda *et al*, 2018). De uma forma global, estima-se que 5% dos cânceres humanos são causados por infecções por HPV (Zur Hausen, 1991; Boda *et al*, 2018).

Uma meta-análise incluindo 243 estudos agrupou a prevalência dos subtipos de HPV em câncer de colo uterino publicados de 1990 a 2010, totalizando um número de 30.848 pacientes (Li *et al*, 2011). A proporção de câncer cervical invasor associada ao HPV16 e/ou HPV18 foi entre 70 e 76% em todas as regiões do mundo, exceto Ásia. Na Ásia Ocidental/Central, 82% dos carcinomas cervicais invasores foram associado ao HPV16/18, em comparação com apenas 68% na Ásia Oriental (Li *et al*, 2011). Os 12 subtipos de HPV identificados mais incidentes em ordem decrescente foram HPV16 (57%), 18 (16%), 58, 33, 45, 31, 52, 35, 59, 39, 51 e 56 (Li *et al*, 2011). Na nossa amostra de pacientes, observamos uma taxa de 69% de incidência de HPV 16/18, o que vai de encontro aos dados da literatura.

A associação entre o genótipo do HPV e o prognóstico do câncer cervical é um ponto de discussão e de dados conflitantes. Muitos estudos relataram que os tumores HPV18-positivo estão associados a um mau prognóstico (Rose *et al*, 1995; Lai *et al*, 2007), enquanto outros estudos não conseguiram identificar essa relação (Hang *et al*, 2017; Tong *et al*, 2007). Alguns grupos sugeriram que os tumores positivos para HPV16 e HPV16/18 estariam associados com melhor sobrevida em populações chinesas e britânicas, respectivamente (Hang *et al*, 2017; Cuschieri *et al*, 2014), enquanto resultados

favoráveis foram relatados para HPV58-positivo em uma população em Taiwan (Lai *et al*, 1999), e para tumores HPV31-positivo também em Taiwan (Huang *et al*, 2004). Em contraste, muitos estudos não encontraram associações entre o genótipo do HPV e o câncer do colo do útero com fatores prognóstico em populações russas e coreanas (Van Muyden *et al*, 1999; Tong *et al*, 2007). Um estudo recente japonês demonstrou melhor sobrevida em tumores HPV 16-positivo comparado com HPV-negativo (10 anos de sobrevida global, 73,7% vs. 39,5%, $p = 0,04$) (Onuki *et al*, 2018). Estes resultados discrepantes podem ser, pelo menos em parte, devidos a diferenças geográficas nas prevalências do tipo HPV e também por outros mecanismos implicados na carcinogênese não ainda elucidados. Na nossa população avaliada, não observamos correlação clínico-patológica e nem impacto em sobrevida quando correlacionamos os subtipos de HPV 16 e 18 às características da população.

A progressão da infecção inicial do HPV para o câncer cervical invasivo é multifatorial. Estudos recentes demonstram que vários fatores genéticos e epigenéticos desempenham um papel importante na carcinogênese do câncer, como alterações no número de cópias, perda de heterozigose, inativação do gene supressor ou ativação do oncogene (Boda *et al*, 2018; Negrini *et al*, 2010; Zur Hausen, 2002; Duensing and Münger, 2004). A instabilidade genômica é uma característica da carcinogênese e reconhecido como um fator importante no acúmulo de genes mutados necessários para o desenvolvimento do câncer que tem sido amplamente discutido na nova era da oncologia (Ojesina *et al*, 2014; Negrini *et al*, 2010; Zur Hausen, 2002). Mutações endógenas e acúmulo de mutações são importantes na patogênese das lesões pré-malignas e na progressão do tumor, que promovem instabilidade genômica para diminuir a capacidade de manter a integridade do DNA (Ojesina *et al*, 2014; Zur Hausen, 2002, Duensing and Münger, 2004).

Estudos publicados demonstraram que a infecção pelo HPV causa instabilidade genômica (ganho ou perda cromossômica) e alterações gênicas, incluindo mutações endógenas e aumento do dano ao DNA que estão associados ao desenvolvimento do câncer (Boda *et al*, 2018; Duensing and Münger, 2004). Esse ponto sugere que outros fatores moleculares também possam estar implicados na patogênese do câncer cervical e talvez aí também esteja oportunidade de novas abordagens terapêuticas.

Está documentado que a expressão das oncoproteínas do HPV E6 e E7 não só inibem os supressores tumorais p53 e Rb, mas também podem alterar vias de sinalização adicionais que podem ser igualmente importantes para transformação neoplásica (Moody

and Laimins, 2010). Entre essas vias, estudos recentes demonstraram que estas mesmas oncoproteínas também podem ativar a via PI3K (Moody and Laimins, 2010; Spaans *et al*, 2015). Como citado anteriormente, o oncogene *PI3K* faz parte de uma família de enzimas envolvidas em diversas vias de manutenção celular como diferenciação, proliferação, migração, etc. A ativação e amplificação anormais da subunidade alfa catalítica do *PI3K* são observadas em diversos tipos de câncer (Gonçalves *et al*, 2018; Moody and Laimins, 2010; Karakas *et al*, 2006) incluso o câncer cervical. Dessa forma, o estudo desta via de sinalização se mostra importante para uma melhor compreensão do comportamento tumoral e também para criar novas opções de tratamento no cenário desta neoplasia com carência de entendimento e acesso.

A prevalência de mutações em PI3K no câncer do colo do útero foi investigada em outras coortes de pacientes na Indonésia (24%) (Spaans *et al*, 2018), Holanda (20%) (Spaans *et al*, 2015), França (27%) (Muller *et al*, 2015), América Latina (31%) (Lou *et al*, 2015), os EUA (31%) (Wright *et al*, 2013) e os dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (26%) (TCGA, 2017). No entanto, frequências mais baixas também foram descritos no Japão (12%) (Wang *et al*, 2015) e na China (12%) (Xiang *et al*, 2015). Contudo, cabe salientar que cada estudo usou técnicas distintas como sequenciamento de exoma, sequenciamento direto, combinações de técnicas, entre outros. No presente estudo, foi utilizado a técnica de PCR em tempo real e encontrado uma prevalência de 29,3% de mutações em PI3K, o que vai de encontro a maioria das séries reportadas na literatura.

Cabe destacar que 70,6% dos tumores cervicais investigados neste estudo com mutação em PI3K foram mutados no domínio helicoidal, denominado p.E545K. Apenas 8,6% das mutações ocorreram no domínio quinase p.H1047R, 3,4% no domínio helicoidal p.E542K e 3,4% no domínio quinase p.H1047L. Este dado vai de encontro às outras coortes de câncer de colo uterino onde o domínio helicoidal p.E545K também foi o mais frequentemente mutado (TCGA, 2017; Lou *et al*, 2015). Contudo, esta é uma característica distinta dos carcinomas cervicais em comparação com outras neoplasias com altas frequências de mutações PIK3CA, tais como endométrio, carcinoma ovariano, mama e colorretal, em que mutações no domínio quinase ocorrem geralmente com a mesma frequência que as mutações no domínio helicoidal (Lou *et al*, 2015). A mutação do domínio quinase H1047R é frequentemente associada a uma taxa de resposta aumentada aos inibidores PI3K/AKT/mTOR (Janku *et al*, 2013). Em um estudo de Wang *et al.*, 15/60 dos cânceres de colo uterino localmente avançado possuíam as mutações

E542K ou E545K (não havia mutações no domínio da quinase), e esses pacientes mostraram uma resposta significativamente pior à quimiorradioterapia baseada em cisplatina (Wang *et al*, 2015). Fica evidente que mais pesquisas são necessárias para desenvolver terapias que possam interferir no domínio específico de mutação no PI3K e também observações quanto ao entendimento das alterações nesta via de sinalização, as quais estão apenas começando.

A alteração da via do PI3K/AKT/mTOR é também conhecida por estar envolvida na resistência à radioterapia, pois regula a dependência do DNA-proteína quinase que é responsável pela reparação das quebras de dupla fita de DNA causadas pela radioterapia e também pelo fato de que a inibição desta via também altera a vascularização e aumenta a hipóxia celular. Poucos estudos até o momento abordaram mutação em PI3K como fator prognóstico para tratamento do câncer cervical. McIntyre *et al* relataram que a sobrevida global (OS) aos 5 anos após a quimiorradiação foi significativamente pior para pacientes mutados em PIK3CA do que com pacientes do tipo selvagem PI3K– sem mutação (70% vs 40%, respectivamente). Neste estudo, esta magnitude de diferença em Sobrevida Global somente foi vista para pacientes com estágios iniciais IB/II, não para estágios III/IV ($p=0,0002$ vs $p=0,98$) (McIntyre *et al*, 2013).

No estudo conduzido por Wang *et al* (2015), pacientes com mutações PI3K apresentaram uma taxa de resposta completa do tumor significativamente menor para quimiorradiação, 52% contra 86% no tipo selvagem PI3K. Os autores também observaram que os pacientes sem alterações genéticas mostraram significativamente maiores respostas tumorais efetivas ao tratamento. Mais recentemente, Lachkar e coautores (2018) também exploraram o papel prognóstico da mutação em PI3K em 59 pacientes com câncer cervical e demonstraram que pacientes com PIK3 do tipo selvagem apresentaram uma sobrevida específica ao câncer significativamente melhor, em comparação com pacientes mutados ($p = 0,044$). É importante salientar que nesta amostra de pacientes, a incidência de mutação em PI3K foi em 12% da população. Análises de sobrevida subsequentes revelaram que a mutação PI3K foi um fator prognóstico significativo para pior sobrevida global (HR: 3,9; IC 95%, 1,3-11,8; $p = 0,017$) e também pior sobrevida específica do câncer (HR:3,6; IC95%, 1,2-11,0; $p =0,024$) (Lachkar *et al*, 2018). Nesta última publicação, os autores sugerem que os inibidores de PI3K podem melhorar os desfechos após quimiorradiação com pacientes em câncer cervical com mutação em PI3K, visualizando uma nova abordagem a ser explorada (Lachkar *et al*, 2018).

No presente estudo, levando em conta que a população é predominantemente EC III/IVA, assim como observado na amostra de Wang *et al* (2008), não foi observado impacto clínico em sobrevida na população mutada, nem impacto no desfecho à quimiorradiação das pacientes no que diz respeito à mutação em PI3K, não havendo significância o fato de ter ou não mutação em PI3K. Esta discrepância observada nos dados com os demais estudos da literatura pode se dever ao fato dos diferentes métodos de análise molecular empregados, subtipos histológicos distintos, população heterogênea, tempos de seguimentos diferentes, bem como diferentes modalidades de tratamento empregadas. Em virtude de toda a argumentação, os presentes dados apontam a necessidade de seguir investigando o papel da alteração desta via de sinalização em câncer de colo uterino e as possíveis implicações em novos tratamentos.

Com o surgimento de novas drogas de alvo moleculares e a mudança da história natural da doença de algumas neoplasias, aumentando consideravelmente a sobrevida global, como vimos em câncer de mama (André *et al*, 2019), faz-se necessário o estudo de vias moleculares alternativas para diferentes tipos de neoplasias. A heterogeneidade tumoral é um fenômeno frequente que pode ser observado tanto na área histológica como na molecular, se manifestando em diversas características como angiogênese, potencial invasivo, crescimento e proliferação celular. As diferenças inter ou intratumorais podem dificultar a aplicação de uma medicina personalizada, podendo levar à falha no tratamento ou, até mesmo, à resistência aos medicamentos. A fim de minimizar esse efeito, a identificação de marcadores moleculares que trazem informações sobre prognóstico e/ou resposta às terapias é de extrema importância para um melhor manejo dos pacientes.

Contudo, entende-se as limitações deste estudo devido à natureza retrospectiva e ao limitado número de pacientes. Acrescentamos, ainda, que as lesões iniciais (carcinoma *in situ* e EC I) não chegam para tratamento até nosso serviço, por se tratar de um centro de referência em oncologia, gerando um viés de seleção.

7. CONCLUSÕES

Observamos na nossa população de pacientes portadoras de câncer cervical um perfil de doença diagnosticado em fases mais avançadas (EC III e IVA), com características clínicas agressivas e tratadas de acordo com os guidelines internacionais. A prevalência de mutação em PI3K foi em 29,3% da população estudada e os genótipos

de HPV 16 e 18 foram identificados em 69% das pacientes. . Em relação às mutações avaliadas em PI3K, a mais frequente foi a p.E545K (éxon 9), encontrada em 12 pacientes (20,7%). Não foi identificada significância estatística quando se analisou a presença de mutação em PI3K e/ou genótipo de HPV com as características clínico-patológicas e desfechos de sobrevida das pacientes.

8. PERSPECTIVAS

As neoplasias induzidas pelo HPV são um grande desafio no entendimento da patogênese e do tratamento do câncer, principalmente em países em desenvolvimento onde a mortalidade destas neoplasias, particularmente do câncer cervical, é expressiva e assume uma porcentagem significativa da causa de óbitos entre as mulheres. Estudos recentes demonstraram que as alterações genéticas também desempenham um papel importante na carcinogênese das neoplasias cervicais e provavelmente estão interligadas com a via de sinalização do HPV. O que observamos é uma vasta lacuna do entendimento de como estas pacientes vêm se apresentando e da pobre resposta aos tratamentos padrões. Dessa forma, estudos explorando alterações moleculares como a via do PI3K/AKT/mTOR, na tentativa de encontrar um biomarcador, são imprescindíveis e devem ser estimuladas neste cenário. Esta via de sinalização em particular é extremamente ampla e interage com diversas outras vias, sendo os dados da amostra desta coorte não passíveis de conclusão global, devendo a comunidade científica instigar outros estudos neste cenário específico.

Na atual era do tratamento personalizado em oncologia, pontua-se a necessidade do entendimento da patogênese do câncer cervical a fim de buscar biomarcadores e tratamentos mais eficazes para as pacientes com câncer cervical.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

André F., Ciruelos E., Rubovszky G., Campone M., Loibl S., Rugo H.S., Iwata H., Conte P., Mayer I.A., Kaufman B., Yamashita T., Lu Y.S., Inoue K., Takahashi M., Pápai Z., Longin A.S., Mills D., Wilke C., Hirawat S., Juric D. (2019) Alpelisib for *PIK3CA*-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 380(20):1929-1940

American Joint Committee on **Cancer** AJCC (2010) Cancer Staging Manual 7. Ed. Disponível (on line) <https://cancerstaging.org/referencetools/deskreferences/Documents/AJCC%207th%20Ed%20Cancer%20Staging%20Manual.pdf> (26 junho)

Arena S., Marconi M., Ubertosi M., Frega A., Arena G., Villani C. (2002) HPV and pregnancy: diagnostic methods, transmission and evolution. *Minerva Ginecol*;54(3):225-37.

Bachman K.E., Park B.H. (2006) Mutation of the *PIK3CA* oncogene in human cancers. *Br J Cancer*;94: 455–459.

Bhatla N., Aoki D., Sharma D.N., Sankaranarayanan R. (2018) Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* Oct;143 Suppl 2:22-36.

Boda D., Docea A.O., Calina D., Ilie M.A., Caruntu C., Zurac S., Neagu M., Constantin C., Branisteanu D.E., Voiculescu V., Mamoulakis C., Tzanakakis G., Spandidos D.A., Drakoulis N., Tsatsakis A.M. (2018) Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). *Int J Oncol.* 52(3):637-655.

Brinton, L.A. (2002) The epidemiology of cervical cancer and human Papillomavirus. International Agency for Research on Cancer, IARC. Ed: N. Muñoz. Lyon.

Bruni L., Diaz M., Castellsague X., Ferrer E., Bosch F.X., de Sanjose S. (2010) Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 202:1789-1799.

Carnero A., Paramio J.M. (2014) The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, *Cancer Mouse Models.* *Front Oncol.* 23;4:252.

Chao A., Tsai C.N., Hsueh S., Lee L.Y., Chen T.C., Huang S.L. (2009) Does Epstein-Barr virus play a role in lymphoepithelioma-like carcinoma of the uterine cervix? *Int J Gynecol Pathol.* 28(3):279–285.

Chalhoub N., Baker S.J. (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 4:127-50.

Chaves F.N. (2017) Estudo da via PI3K/AKT e da perda de Heterozigosidade do gene supressor tumoral PTEN em lesões potencialmente malignas e Carcinoma epidermoide oral. 2017. **Dissertação de Doutorado.** Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Collins Y, Einstein M.H., Gostout B.S., Herzog T.J., Massad L.S., Rader J.S., et al. (2006) Cervical cancer prevention in the era of prophylactic vaccines: A preview for gynecologic oncologists. *Gynecol Oncol.*102(3):552-562.

Cuschieri, D.H. Brewster, C. Graham, S. Nicoll, A.R. Williams, G.I. Murray, Millan D, Johannessen I., Hardie A., Cubie H.A. (2014) Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 135: 2721–2726.

Degefu S., O’Quinn A.G., Lacey C.G., Merkel M., Barnard D.E. (1986) Verrucous carcinoma of the cervix: a report of two cases and literature review. *Gynecol Oncol.* 25(1):37–47.

Diaz De Vivar A., Roma A.A., Park K.J., Alvarado-Cabrero I., Rasty G., Chanona-Vilchis J.G. (2013) Invasive endocervical adenocarcinoma: proposal for a new pattern-based classification system with significant clinical implications: a multi-institutional study. *Int J Gynecol Pathol.* 32(6):592–601.

Duensing S., Münger K.(2004) Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer.* 109(2):157–162.

Faridi R., Zahra A., Khan K., Idrees M. (2011) Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology* 8:269.

Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia – FEBRASGO (2018) . Câncer de Colo Uterino – Fatores de Risco, n 114. São Paulo, p 6-7.

Fresno Vara J.A, Casado E., de Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C., González-Barón M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 30(2):193-204.

Fujiwara K., Monk B., Devouassoux-Shisheboran M. (2014) Adenocarcinoma of the uterine cervix:why is it different? *Curr Oncol Rep.* 16(12):416.

FUTURE II Study Group. (2007) Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med.*356(19): 1915-1927.

Garland S.M., Hernandez-Avila M., Wheeler C.M., Perez G., Harper D.M., Leodolter S., Tang G.W., Ferris D.G., Steben M., Bryan J., Taddeo F.J., Railkar R., Esser M.T., Sings H.L., Nelson M., Boslego J., Sattler C., Barr E., Koutsky L.A. (2007) Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med.*356(19):1928-1943.

Ghittoni R., Accardi R., Chiocca S. and Tommasino M. (2015) Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *ecancermedicalscience*. 9:526.

Goncalves M.D., Hopkins B.D., Cantley L.C. (2018) Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer. *N Engl J Med*. 379(21):2052-2062.

Grayson W., Cooper K. (2002) A reappraisal of “basaloid carcinoma” of the cervix, and the differential diagnosis of basaloid cervical neoplasms. *Adv Anat Pathol*. 9(5):290–300.

Gustin J.P., Karakas B., Weiss M.B., Abukhdeir A.M., Luring J., Garay J.P., Cosgrove D., Tamaki A., Konishi H., Konishi Y., Mohseni M., Wang G., Rosen D.M., Denmeade S.R., Higgins M.J., Vitolo M.I., Bachman K.E., Park B.H. (2009) Knockin of mutant PIK3CA activates multiple oncogenic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:2835–2840

Haghshenas M.R., Mousavi T., Kheradmand M., Afshari M., Moosazadeh M. (2017) Efficacy of Human Papillomavirus L1 Protein Vaccines (Cervarix and Gardasil) in Reducing the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Meta-analysis. *Int J Prev Med*. 8:44.

Hang D., Jia M., Ma H., Zhou J., Feng X., Lyu Z., Yin J., Cui H., Yin Y., Jin G., Hu Z., Shen H., Zhang K., Li N., Dai M. (2017) Independent prognostic role of human papillomavirus genotype in cervical cancer. *BMC Infect Dis*.17(1):391.

Huang L.W., Chao S.L., Hwang J.L. (2004) Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer* 100: 327–334.

Instituto Nacional do Câncer – INCA (2016). . Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

Instituto Nacional do Câncer – INCA (2018) Estimativa 2018. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível (on line)

<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil> (26 de junho).

Instituto Nacional do Câncer - INCA (2019). Atlas da Mortalidade. Disponível (online) <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/> (26 de junho).

Janku F., Wheler J.J., Naing A., Falchook G.S., Hong D.S., Stepanek V.M., Fu S., Piha-Paul S.A., Lee J.J., Luthra R., Tsimberidou A.M., Kurzrock R. (2013) PIK3CA mutation H1047R is associated with response to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in early-phase clinical trials. *Cancer Res.* 73 (2013) 276–284.

Janku F., Yap T.A. and Meric-Berstan F. (2018) Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology* 15: 273–291

Jelovac D., Beaver J.A., Balukrishna S., Wong H.Y., Toro P.V., Cimino-Mathews A., Argani P., Stearns V., Jacobs L., VanDenBerg D., Kessler J., Jeter S., Park B.H., Wolff A.C. (2014) A PIK3CA mutation detected in plasma from a patient with synchronous primary breast and lung cancers. *Hum Pathol.* 45(4):880–3.

Koh W.J., Abu-Rustum N.R., Bean S., Bradley K., Campos S.M., Cho K.R., Chon H.S., Chu C., Clark R., Cohn D., Crispens M.A., Damast S., Dorigo O., Eifel P.J., Fisher C.M., Frederick P., Gaffney D.K., Han E., Huh W.K., Lurain J.R., Mariani A., Mutch D., Nagel C., Nekhlyudov L., Fader A.N., Remmenga S.W., Reynolds R.K., Tillmanns T., Ueda S., Wyse E., Yashar C.M., McMillian N.R., Scavone J.L. (2019) Cervical Cancer, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 17(1):64-84.

Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R. (2007) “Chapter 19 the female genital system and breast”. *Robbins basic pathology*. 8th ed ISBN 1-4160-2973-7. Philadelphia: Saunders.

Lachkar B., Minaguchi T., Akiyama A., Liu S., Zhang S., Xu C., Shikama A., Tasaka N., Sakurai M., Nakao S., Ochi H., Yoshikawa H., Satoh T. (2018) Prognostic

significance of PIK3CA mutation in stage IIB to IVA cervical cancers treated by concurrent chemoradiotherapy with weekly cisplatin. *Medicine* 97(31):e11392.

Lai H.C, Sun C.A., Yu M.H., Chen H.J., Liu H.S., Chu T.Y. (1999) Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papilloma virus type 58 and related types. *Int J Cancer* 84: 553–557.

Lai C.H., Chang C.J., Huang H.J., Hsueh S., Chao A., Yang J.E., Lin C.T., Huang S.L., Hong J.H., Chou H.H., Wu T.I., Huang K.G., Wang C.C., Chang T.C. (2007) Role of human papillomavirus genotype in prognosis of early-stage cervical cancer undergoing primary surgery. *J Clin. Oncol.* 25: 3628–3634.

Lee E.Y.H.P. and Muller W.J. (2010) *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(10): a003236.

Li N., Franceschi S., Howell-Jones R., Snijders P.J., Clifford G.M. (2011) Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 128(4):927-935.

Lou H., Villagran G., Boland J.F., Im K.M., Polo S., Zhou W., Odey U., Juárez-Torres E., Medina-Martínez I., Roman-Basaure E., Mitchell J., Roberson D., Sawitzke J., Garland L., Rodríguez-Herrera M., Wells D., Troyer J., Pinto F.C., Bass S., Zhang X., Castillo M., Gold B., Morales H., Yeager M., Berumen J., Alvirez E., Gharzouzi E., Dean M. (2015) Genome Analysis of Latin American Cervical Cancer: Frequent Activation of the PIK3CA Pathway. *Clin Cancer Res.* 21(23):5360-5370.

Martini M., De Santis M.C., Braccini L., Gulluni F., Hirsch E. (2014) PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 46(6):372-383.

Massacesi C., Di Tomaso E., Urban P., Germa C., Quadt C., Trandafir L., Aimone P., Fretault N., Dharan B., Tavorath R., Hirawat S. (2016) PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *Onco Targets Ther.* 9:203-10.

McIntyre J.B., Wu J.S., Craighead P.S., Phan T., Köbel M., Lees-Miller S.P., Ghatage P., Magliocco A.M., Doll C.M. (2013) PIK3CA mutational status and overall survival in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy. *Gynecol Oncol.*128:409–14.

Mirhashemi R., Ganjei-Azar P., Nadji M., Lambrou N., Atamdede F., Averette H.E.(2003) Papillary squamous cell carcinoma of the uterine cervix: an immunophenotypic appraisal of 12 cases. *Gynecol Oncol.* 90(3):657–61.

Moody C.A, Laimins L.A. (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 10(8):550–60.

Muller E., Brault B., Holmes A., Legros A., Jeannot E., Campitelli M., Rousselin A., Goardon N., Frébourg T., Krieger S., Crouet H., Nicolas A., Sastre X., Vaur D., Castéra L. (2015) Genetic profiles of cervical tumors by high-throughput sequencing for personalized medical care. *Cancer Med.* 4: 1484–1493.

Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D. (2010) Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(3):220–228.

Ojesina A.I., Lichtenstein L., Freeman S.S., Pedamallu C.S., Imaz-Rosshandler I., Pugh T.J., Cherniack A.D., Ambrogio L., Cibulskis K., Bertelsen B., Romero-Cordoba S., Treviño V., Vazquez-Santillan K., Guadarrama A.S., Wright A.A., Rosenberg M.W., Duke F., Kaplan B., Wang R., Nickerson E., Walline H.M., Lawrence M.S., Stewart C., Carter S.L., McKenna A., Rodriguez-Sanchez I.P., Espinosa-Castilla M., Woie K., Bjorge L., Wik E., Halle M.K., Hoivik E.A., Krakstad C., Gabiño N.B., Gómez-Macías G.S., Valdez-Chapa L.D., Garza-Rodríguez M.L., Maytorena

G., Vazquez J., Rodea C., Cravioto A., Cortes M.L., Greulich H., Crum C.P., Neuberg D.S., Hidalgo-Miranda A., Escareno C.R., Akslen L.A., Carey T.E., Vintermyr O.K., Gabriel S.B., Barrera-Saldaña H.A., Melendez-Zajgla J., Getz G., Salvesen H.B., Meyerson M. (2014) Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 506(7488):371-375.

Onuki M., Matsumoto K., Tenjimbayashi Y., Tasaka N., Akiyama A., Sakurai M., Minaguchi T., Oki A., Satoh T., Yoshikawa H. (2018) Human papillomavirus genotype and prognosis of cervical cancer: Favorable survival of patients with HPV16-positive tumors. *Papillomavirus Res* 6:41-45.

Parkin D.M., Bray F. (2006) Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 24 (Suppl3):S11-25.

Paavonen J., Jenkins D., Bosch F.X., Naud P., Salmerón J., Wheeler C.M., Chow S.N., Apter D.L., Kitchener H.C., Castellsague X., de Carvalho N.S., Skinner S.R., Harper M., Hedrick J.A., Jaisamrarn U., Limson G.A., Dionne M., Quint W., Spiessens B., Peeters P., Struyf F., Wieting S.L., Lehtinen M.O., Dubin G. (2007) Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 369(9580):2161-2170.

Paavonen J., Naud P., Salmerón J., Wheeler C.M., Chow S., Apter D., Kitchener H., Castellsague X., Teixeira J.C., Skinner S.R., Hedrick J., Jaisamrarn U., Limson G., Garland S., Szarewski A., Romanowski B., Aoki F.Y., Schwarz T.F., Poppe W.A., Bosch F.X., Jenkins D., Hardt K., Zahaf T., Descamps D., Struyf F., Lehtinen M., Dubin G. (2009). Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 374(9686):301-314.

Palmer T., Wallace L., Pollock K.G., Cuschieri K., Robertson C. Kavanagh K. C., Cruickshank M. (2019) Prevalence of cervical disease at age 20 after immunisation with bivalent HPV vaccine at age 12-13 in Scotland. *BMJ* 365 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.11161>.

Patel C., Brotherton J.M., Pillsbury A., Jayasinghe S., Donovan B., Macartney K., Marshall H. (2018). The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: what additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent? *Euro Surveill.* 23:30-41.

Pecorelli S., Zigliani L., Odicino F. (2009) Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet.* 105:107–108.

Polivka J. Jr & Janku F. (2014) Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol. Ther.* 142: 164–175.

Rose B.R., Thompson C.H., Simpson J.M., Jarrett C.S, Elliott P.M., Tattersall M.H., Dalrymple C., Cossart Y.E. (1995) Human papillomavirus deoxyribonucleic acid as a prognostic indicator in early-stage cervical cancer: a possible role for type 18. *Am J Obstet Gynecol.* 173: 1461–1468.

Samuels Y., Waldman T. (2010) Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol.* 347: 21-41.

Saslow D., Solomon D., Lawson H.W., Killackey M., Kulasingam S., Cain J., Garcia F.A., Moriarty A.T., Waxman A.G., Wilbur D.C., Wentzensen N., Downs L.S. Jr, Spitzer M., Moscicki A.B., Franco E.L., Stoler M.H., Schiffman M., Castle P.E., Myers E.R. (2012) American Cancer Society ,American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer : *CA Cancer J Clin.* 62(3): 147–172.

Simons A.M., Phillips D.H., Coleman D.V. (1993) Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. *BMJ*. 306(6890): 1444–1448.

Snijders P.J., van den Brule A.J., Schrijnemakers H.F., Snow G., Meijer C.J., Walboomers J.M. (1990) The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol*. 71:173–181.

Smits H.L., Tieben L.M., Tjong-A-Hung S.P., Jebbink M.F., Minnaar R.P., Jansen C.L., ter Schegget J. (1992) Detection and typing of human papillomaviruses present in fixed and stained archival cervical smears by a consensus polymerase chain reaction and direct sequence analysis allow the identification of a broad spectrum of human papillomavirus types. *J Gen Virol*. 73:3263–3268.

Spaans V.M., Nyoman Bayu Mahendra I, Purwoto G., Trietsch M.D., Osse M., Ter Haar N., Peters A.A.W., Fleuren G.J., Jordanova E.S. (2017) The landscape of somatic mutations in Indonesian cervical cancer is predominated by the PI3K pathway *Gynecol Oncol*. 148(1):189-196.

Spaans V.M., Trietsch M.D., Peters A.A, Osse M., Ter Haar N., Fleuren G.J., Jordanova E.S. (2015) Precise classification of cervical carcinomas combined with somatic mutation profiling contributes to predicting disease outcome. *PLoS One*. 10(7):e0133670.

Tewari K.S., Sill M.W., Long H.J., Penson R.T., Huang H., Ramondetta L.M., Landrum L.M., Oaknin A., Reid T.J., Leitao M.M., Michael H.E., Monk B.J. (2014) Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med*. 20;370(8):734-43.

Tong S.Y., Y.S. Lee Y.S., Park J.S., Tong S.Y., Namkoong S.E. (2007) Human papillomavirus genotype as a prognostic factor in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 17: 1307–1313.

Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *Ca Cancer J Clin.* 65:87–108.

Van Muyden R.C., Ter Harmsel B.W., Smedts F. M., Hermans J., Kuijper J.C., Raikhlin N.T., Petrov S., Lebedev A., Ramaekers F.C., Trimbos J.B., Kleter B., Quint W.G. (1999) Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian women: a prognostic study. *Cancer* 85: 2011–2016.

Xiang, J. Li, W. Jiang, X. Shen, W. Yang, X. Wu, et al., Comprehensive analysis of targetable oncogenic mutations in Chinese cervical cancers, *Oncotarget* 6 (2015) 4968–4975.

Zhang L., Dai Y., Chen J., Hong L., Liu Y., Ke Q., Chen Y., Cai C., Liu X., Chen Z. (2018) Comparison of the performance in detection of HPV infections between the high-risk HPV genotyping real time PCR and the PCR-reverse dot blot assays. *J Med Virol.* 90(1):177-183.

Wang J., Chai Y.L., Wang T., Liu J.H., Dai P.G, Liu , Z. (2015) Genetic alterations of PIK3CA and tumor response in patients with locally advanced cervical squamous cell carcinoma treated with cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy. *Exp Mol Pathol.* 98: 407–410.

World Health Organization WHO (2002). National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. 2.ed. Geneva. (on line)
<https://www.who.int/cancer/modules/Prevention%20Module.pdf>> (26 junho).

World Health Organization WHO (2007). Cancer Control. WHO guide for effective programmes. Switzerland. Disponível (on line)
<www.who.int/cancer/modules/Prevention%20Module.pdf> (26 junho).

World Health Organization WHO (2017). Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. *Wkly Epidemiol Rec.*;92:241–268.

World Health Organization WHO (2018). GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Disponível (on line) <http://globocan.iarc.fr/> (26 de junho).

Wright A.A., Howitt B.E., Myers A.P., Dahlberg S.E., Palesscandolo E., Van Hummelen P., MacConaill L.E., Shoni M., Wagle N., Jones R.T., Quick C.M., Laury A., Katz I.T., Hahn W.C., Matulonis U.A., Hirsch M.S. (2013) Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer* 119: 3776–3783.

Yokota J. (2000) Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 21(3):497-503.

Zur Hausen H. (1991) Viruses in human cancers. *Science*. 254(5035):1167-73.

Zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*. 2(5):342-50.