CAMILA MOTTA VENCHIARUTTI MONIZ

**Perfil de expressão de biomarcadores no
carcinoma de canal anal e correlação com falha
ao tratamento com quimio-radioterapia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moniz, Camila Motta Venchiarutti

Perfil de expressão de biomarcadores no carcinoma de canal anal e correlação com falha ao tratamento com quimio-radioterapia / Camila Motta Venchiarutti Moniz -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Paulo Marcelo Gehm Hoff.

Descritores: 1.Neoplasias do ânus 2.Terapia combinada 3.Biomarcadores 4.HIV
5.*Papillomaviridae* 6.Canal anal

USP/FM/DBD-272/17

Dedicatória

Ao meu avô Pedro Motta (in memoriam)

Agradecimentos

A Deus por abençoar todos os dias de minha vida.

Aos meus pais Solange e Carlos, pelo amor e tempo dedicados e pelo esforço para que eu pudesse estudar medicina.

Ao meu irmão Marcelo, pelo convívio e apoio.

Ao meu marido Ravendra, pelo amor incondicional à nossa família, além do constante incentivo ao meu trabalho.

Às minhas filhas Helena e Luiza, por fazerem parte da minha vida e torná-la mais alegre todos os dias.

Aos meus sogros Valeria e Egídio, pelo apoio nos momentos de ausência dedicados ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo M. Hoff, pela orientação deste projeto, além do constante exemplo de competência.

À Dra. Renata A. Coudry, pela co-orientação e valiosas contribuições neste projeto.

À Dra. Rachel S. P. Riechelmann, pela amizade e por inúmeras horas dedicadas à elaboração e execução deste projeto, além do incentivo diário à pesquisa clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

À Suilane C. Ribeiro, Thomas G. Rivelli, Giovanni M. Bariani, André Chen, Rejane Franco, Caio Nahas, Allan A. L. Pereira, Maria Ignez F. M. Braghiroli, Cintia Ortega, Sibeles Meireles, Luisa Lina Villa e Jorge Sabbaga pelas contribuições ao projeto.

Aos meus colegas: Ana Carolina C. de Gouveia, Anezka R. C. Ferrari, Diego A. Toloi, Giovanni M. Bariani, Maria Ignez F. M. Braghiroli, Carolina C. L. Barbosa, Juliana Florinda M. Rêgo, Carlos H. dos Anjos e Denyei Nakazato, pela amizade e companhia durante jornada da residência de oncologia clínica.

Ao Dr. Daniel F. Saragiotto, pelo empenho em melhorar a cada dia a formação dos residentes do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

À Dra. Maria Aparecida Barone Teixeira e a todos os professores que tive ao longo da vida. Sua dedicação e paciência certamente contribuíram para minha formação humana e acadêmica.

Agradeço a todos os pacientes, sem os quais não haveria pesquisa clínica.

Normatização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors*. (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Listas de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia	2
1.2 Anatomia	2
1.3 Aspectos histopatológicos	4
1.4 Fatores de risco	7
1.5 Tratamento da doença localizada	10
1.6 Câncer de canal anal metastático	16
1.7 Biomarcadores no câncer de canal anal	16
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS DO ESTUDO	23
3.1 Objetivo primário	24
3.2 Objetivos secundários	24
4 MÉTODOS	25
4.1 Desenho do estudo	26
4.2 Desfechos	26
4.3 Critérios de seleção dos pacientes	27
4.3.1 Critérios de inclusão	27
4.3.2 Critérios de exclusão	28
4.4 Metodologia	28
4.4.1 Acompanhamento clínico, tratamento oncológico e avaliação de toxicidade dos pacientes	28
4.4.2 Método de estadiamento e avaliação de resposta radiológica ao tratamento	30
4.4.3 Avaliação histológica das amostras de tecido tumoral e extração de DNA	33

4.4.3.1	Protocolo de avaliação de integridade da amostra.....	34
4.4.3.2	Análise de mutações por NGS.....	34
4.4.3.3	Pesquisa de HPV	38
4.4.3.4	Pesquisa de Ki-67	41
4.4.3.5	PD-L1	42
4.5	Considerações estatísticas.....	42
4.6	Aspectos éticos	43
4.7	Financiamento.....	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Recrutamento e características da população incluída	47
5.2	Avaliação de resposta	50
5.3	Características do tratamento oncológico	54
5.4	Avaliação de toxicidade.....	55
5.5	Avaliação de biomarcadores.....	57
5.5.1	HPV	58
5.5.2	Sequenciamento do DNA tumoral por NGS	60
5.5.3	Expressão de PD-L1	63
5.5.4	Expressão de Ki-67.....	65
5.5.5	Associação dos biomarcadores com resposta.....	66
5.5.6	Associação dos biomarcadores com sobrevida global e sobrevida livre de progressão.....	70
6	DISCUSSÃO.....	71
7	PERSPECTIVAS	87
8	CONCLUSÕES.....	90
9	ANEXOS.....	93
	Anexo 1 - Estadiamento TNM - AJCC VII edição.....	94
	Anexo 2 - Agrupamento por Estadio - AJCC VII Edição	95
	Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	96
	Anexo 4 - Aprovação pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.....	100
	Anexo 5 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina em da Universidade de São Paulo	101

Anexo 6 – Aprovação de emenda, referente às atualizações do projeto em 08/03/2017 - MM1200/16	102
Anexo 7 - Sequenciamento Genético - ΔCq	103
Anexo 8 - Sequenciamento Genético.....	104
Anexo 9 - Expressão de PD-L1, presença de HPV e HIV status ...	106
Anexo 10 - Pesquisa de Ki-67.....	108
10 REFERÊNCIAS	110

Listas

SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluouracil
ACCORD	<i>Action Clinique Coordonnées en cancérologie Digestive</i>
ACT	<i>Anal Cancer Trial</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Alfa-PVs	Alfapapilomavírus
bp	Pares de base
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEC	Carcinoma epidermóide
DE	Doença estável
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPD	Diidropirimidina desidrogenase
EC	Estadiamento
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Gy	Gray
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-	Vírus da Imunodeficiência Humana negativo
HIV+	Vírus da Imunodeficiência Humana positivo
HPV	Papilomavírus Humano
HPV-	Papilomavírus Humano negativo
HPV+	Papilomavírus Humano positivo
IAM	Infarto agudo do miocárdio

Ki-67	<i>Proliferation-related ki-67 antigen</i>
M	Metástase a distância
<i>MET</i>	<i>MET gene</i>
N	Linfonodo
NGS	Sequenciamento genético de nova geração
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Progressão de doença
PD-L1	<i>Programmed death-ligand</i>
PI3Ks	Fosfoinosítídeo 3-quinases
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
QRT	Químio-radioterapia
RC	Resposta completa
RECIST	Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Resposta parcial
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
SG	Sobrevida global
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SLP	Sobrevida livre de progressão
T	Tamanho
<i>TP53</i>	<i>Transformation-related protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SÍMBOLOS

%	por cento
:	para
,	linha
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
=	igual
h	hora
μm	micrometro
m ²	metro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
°C	grau centígrado

TABELAS

Tabela 1 - Cobertura de sequenciamento genético pelo painel TruSight Tumor 26 Illumina®.....	37
Tabela 2 - Tipos de HPV investigados	41
Tabela 3 - Características da população.....	49
Tabela 4 - Resposta ao tratamento	50
Tabela 5 - Resposta ao tratamento de acordo com <i>status</i> HIV	52
Tabela 6 - Resposta ao tratamento de acordo com estadiamento	53
Tabela 7 - Características do tratamento.....	54
Tabela 8 - Toxicidades ao tratamento	55
Tabela 9 - Mutações no DNA tumoral.....	62
Tabela 10 - Expressão de PD-L1 nos pacientes HIV+	64
Tabela 11 - Análises de regressão logística univariada para prever resposta completa aos 6 meses pós QRT	66
Tabela 12 - Análises de regressão logística multivariada para prever resposta completa aos 6 meses pós QRT.....	67
Tabela 13- Análises de regressão logística univariada para prever resposta completa ou parcial aos 6 meses pós QRT	68
Tabela 14 - Análises de regressão logística multivariada para prever resposta completa ou parcial aos 6 meses pós QRT.....	69
Tabela 15 - Mutações de <i>PIK3CA</i> no câncer de canal anal	74
Tabela 16 - Mutação no gene <i>KRAS</i>	78
Tabela 17 - Mutação do gene <i>BRAF</i>	79
Tabela 18 - Mutação no gene <i>EGFR</i>	79

FIGURAS

Figura 1 - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau, com células basalóides anormais	5
Figura 2 - Carcinoma epidermóide de canal anal	6
Figura 3 - História natural da infecção persistente por HPV e progressão do tecido normal para neoplasia.....	9
Figura 4 - Recrutamento	48
Figura 5- Pesquisa de biomarcadores	57
Figura 6 - Pesquisa de HPV na hibridização <i>in situ</i>	58
Figura 7 - Pesquisa de HPV	59
Figura 8 - Pesquisa de PD-L1	63
Figura 9 - Pesquisa de Ki-67	65

Resumo

Moniz CMV. *Perfil de expressão de biomarcadores no carcinoma de canal anal e correlação com falha ao tratamento com quimio-radioterapia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: O tumor de canal anal é raro, sendo a histologia epidermóide a mais frequente. A quimio-radioterapia é capaz de curar a maioria dos casos de câncer de canal anal localizado, entretanto, um grupo de pacientes apresenta resistência primária ao tratamento multimodal. **Métodos:** Estudo de coorte prospectivo desenhado para avaliar a influência de biomarcadores (HIV, Ki-67, PD-L1, HPV e mutações no DNA tumoral) na resposta do câncer de canal anal ao tratamento com quimio-radioterapia. Resposta completa aos 6 meses após tratamento foi o desfecho primário. O DNA tumoral foi avaliado por sequenciamento genético, através do painel TruSight Tumor 26®. HPV foi testado pelo teste PapilloCheck®. Ki-67 e PD-L1 foram avaliados por imunoistoquímica. Sorologia para HIV foi realizada em todos os pacientes antes do início do tratamento. **Resultados:** Os pacientes foram recrutados de outubro/2011 a dezembro/2015 e 75 foram avaliados para resposta após o tratamento. A idade mediana foi de 57 anos, a maioria dos pacientes apresentou estadio III ao diagnóstico 65% (n=49) e 12% (n=9) tinha sorologia positiva para HIV. Aos 6 meses após término da quimio-radioterapia 62,7% (n=47) dos pacientes apresentou resposta completa, 24% (n=18) resposta parcial e 13,3% (n=10) progressão de doença. HPV foi avaliado em 67 amostras e encontrado em 70,1%, sendo o HPV 16 o tipo mais frequente. A pesquisa de PD-L1 foi realizada em 61 amostras e 16,4% (n=10) apresentou expressão > 1%. Idade, estadio clínico, HIV, expressão de Ki-67, presença de HPV, expressão de PD-L1 e interrupção de tratamento foram avaliados como preditores de resposta, aos 6 meses após o término do tratamento, por meio de regressão logística multivariada. Pacientes com estadio II apresentaram 4,7 vezes mais chance de resposta completa que pacientes com estadio III (OR=4,70; IC95%=1,36-16,30; p=0,015). Quando considerada resposta completa e/ou parcial, a presença do vírus HIV foi associada a pior resposta: pacientes HIV negativo apresentaram 5,7 vezes mais chance de resposta completa e/ou parcial que pacientes HIV positivo (OR=5,72; IC95%=2,5-13,0; p<0,001). Foi possível a realização de sequenciamento

do DNA tumoral em 25 pacientes avaliáveis para resposta, sendo as mutações mais frequentes encontradas nos genes *PIK3CA* (n=6) e *MET* (n=6). Não houve diferença em resposta de acordo com presença dessas mutações. **Conclusões:** Aos 6 meses após término do tratamento com quimio-radioterapia a expressão de Ki-67, PD-L1, presença de HPV e mutações em *PIK3CA* e *MET* não foram associadas com resposta ao tratamento. Pacientes com estadio III e pacientes portadores do vírus HIV apresentaram pior resposta ao tratamento.

Descritores: neoplasias do ânus; terapia combinada; biomarcadores; HIV; *Papillomaviridae*; canal anal

Abstract

Moniz CMV. *Prospective study of biomarkers in squamous cell carcinoma of the anal canal and their influence on treatment outcomes* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Background: While chemoradiation is the curative treatment for squamous cell carcinoma of the anal canal, some patients present primary resistance. As a rare tumor, predictors of response remain unknown. **Patients and Methods:** Prospective cohort study aimed at evaluating biomarkers (Ki-67, PD-L1, Human papillomavirus (HPV), tumor mutations and HIV) possibly associated with tumor response to chemoradiation. Complete response at 6 months was the primary endpoint. Tumor DNA was analyzed by next-generation sequencing (TruSight Tumor 26 ®). HPV was tested by PapilloCheck®. KI-67 and PD-L1 were evaluated by immunohistochemistry. **Results:** Seventy-eight patients were recruited from October/2011 to December/2015, and 75 were evaluable for response. Median age was 57 years, 65% (n=49) were stage III, and 12% (n=9) were HIV positive (HIV+). At 6 months 62.7% (n=47) presented complete response, 24% (n=18) partial response and 13.3% (n=10) disease progression. HPV was evaluated in 67 and found in 70.1%, the majority being HPV 16. PD-L1 was tested in 61 being 16.4% (n=10) positive. Age, clinical stage, HIV status, KI-67, HPV, PD-L1 and treatment interruption were tested as predictive factors for complete response at 6 months by logistic regression. On multivariate analyses, stage II patients were 4.7 more likely to achieve complete response than stage III (OR=4.70; IC95%=1.36-16.30; p=0.015). When we considered patients with complete and partial response, HIV+ was associated with a worse response (OR=5.72; IC95%=2.5-13.0; p<0.001). Twenty-five patients had samples proper for NGS and 17 had at least one mutation, with *PIK3CA* (n=6) and *MET* (n=6) being the most common mutated genes. There were no differences in response according to *MET* or *PIK3CA* status. **Conclusions:** At 6 months after chemoradiation Ki-67, PD-L1, HPV and mutations in *PIK3CA* and *MET* were not associated with response. Patients with stage III disease and patients HIV+ had a significantly poor response.

Descriptors: anus neoplasms; combined modality therapy; biomarkers; HIV; Papillomaviridae; anal canal.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O câncer do canal anal é uma neoplasia que representa 2,6% dos casos de tumores que acometem o trato gastrointestinal.⁽¹⁾ Apesar de raro, vem apresentando aumento de 4% em sua incidência anual no Brasil ⁽²⁾ e, segundo dados da Fundação Oncocentro de São Paulo ⁽³⁾, 2.338 casos foram diagnosticados entre 2000 e 2016. O Instituto Nacional José de Alencar Gomes da Silva ⁽⁴⁾ estima 348 mortes pela doença em 2013. Todavia, existe uma considerável heterogeneidade nos registros de *causa mortis* nas diferentes regiões do país, sendo atualmente difícil mensurar o real impacto do câncer de canal anal na população brasileira. Nos Estados Unidos da América foram estimados 8.200 casos novos e 1.100 mortes por câncer de canal anal para o ano de 2017. ⁽¹⁾

1.2 Anatomia

O canal anal é a parte terminal do intestino grosso com início no ânus, passando pelo assoalho pélvico e terminando no ânus; que

é definido como a abertura externa do trato gastrintestinal. O anel anorretal é formado pelo esfíncter externo, pelo esfíncter interno, pela musculatura longitudinal e pelo elevador do ânus (feixe puborretal), sendo o elevador do ânus responsável pelo controle voluntário da entrada de fezes no canal anal.⁽⁵⁾

A linha pectínea (também chamada de denteada) é composta pelas válvulas anais e bases das colunas anais. Representa a divisão anatômica macroscópica do reto com o canal anal. A linha pectínea se origina no ponto de união embrionária do ectoderma com o endoderma.⁽⁶⁾

O epitélio do canal anal pode ser dividido em três zonas. A parte superior é constituída por mucosa tipo colorretal. A zona de transição é composta por um epitélio especializado, se inicia na linha pectínea e se estende por 0,5-1 cm. A região distal do canal anal é constituída por epitélio escamoso, que pode ser parcialmente queratinizado.⁽⁵⁾

O suprimento sanguíneo é mantido por ramos da artéria retal superior, ramo retal inferior da artéria pudenda e ramos da artéria sacral mediana.

A drenagem venosa é dividida em duas porções, drenando a parte superior à linha denteada para veia retal superior, veia mesentérica e sistema portal. A porção abaixo da linha denteada drena para veia retal inferior, veia pudenda e veia ilíaca interna.

A drenagem linfática da região abaixo da linha denteada é realizada através dos gânglios inguinais e femorais e da região acima da linha denteada através dos linfonodos perirretais e periaórticos.⁽⁵⁾

1.3 Aspectos histopatológicos

A infecção por HVP pode induzir a transformação do epitélio da região anal, ocasionando displasia. De forma semelhante às lesões de colo uterino, ocasionadas por HPV, as displasias intraepiteliais de baixo grau do canal anal podem regredir espontaneamente ou progredir para displasia intraepitelial de alto grau (Figura 1) e posteriormente para carcinoma invasivo (Figuras 2 e 3). A progressão da neoplasia intraepitelial de alto grau para carcinoma invasivo ocorre em 2 a 9% dos casos, podendo atingir 50% em pacientes imunocomprometidos.⁽⁷⁾

Segundo a classificação da *World Health Organization (WHO)*, publicada em 2010, os tumores do canal anal são divididos em epiteliais (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de pequenas células, tumores carcinóides, carcinoma indiferenciado e outros); melanomas; tumores não epiteliais e tumores secundários.

Fonte: Adaptado de Surg Oncol Clin N Am. 2017 Jan;26(1):57-71. Hoff et al, Pathology of Anal Cancer. 2017. Usado com a permissão de Elsevier ⁽⁸⁾

Figura 1 - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau, com células basalóides anormais. Observa-se relação citoplasmática/nuclear aumentada em toda a espessura do epitélio, mas restrita à membrana basal

A histologia mais comum do câncer de canal anal é o carcinoma epidermóide (CEC) (Figura 2), que corresponde a 85% dos casos. A maioria dos tumores apresenta múltiplos graus de diferenciação. São descritas características basalóides em 25% a 65% dos casos e alguns autores postulam que tais achados sugerem origem no epitélio da zona transicional. Por ser considerado uma variante não queratinizante do carcinoma epidermóide e pelo fato da maioria dos tumores de canal ser bastante heterogênea na avaliação histológica, a classificação como subtipo basalóide (também chamado de juncional ou cloacogênico) vem sendo abandonada e não foi contemplada pela WHO em 2010. ⁽⁹⁾

O adenocarcinoma de canal anal corresponde a 5-10% dos casos de câncer de canal anal.⁽¹⁰⁾ Outras histologias como melanomas, tumores neuroendócrinos, carcinoma de pequenas células, tumores mesenquimais, tumores indiferenciados e metástases para região anal são ainda mais raras, ocorrendo em menos de 1% dos casos.⁽⁸⁾

Fonte: Adaptado de Surg Oncol Clin N Am. 2017 Jan;26(1):57-71. Hoff et al, Pathology of Anal Cancer. 2017. Usado com a permissão de Elsevier⁽⁸⁾

Figura 2 - Carcinoma epidermóide de canal anal. (A) Áreas de queratinização anormal. (B) Tumor com características basalóides. (C) Agrupamentos de células neoplásicas com áreas de queratinização

1.4 Fatores de risco

Papilomavírus Humano

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus pequeno, não envelopado e com dupla hélice de DNA em forma circular. Possui genoma de aproximadamente 8.000 pares de base (bp). Já existem mais de 240 tipos descritos ⁽¹¹⁾ e podem ser classificados em Alfapapilomavírus (Alfa-PVs), Betapapilomavírus, Gamapapilomavírus, Mupapilomavírus e Nupapilomavírus. Os Alfa-PVs são comumente relacionados à infecção de mucosa e os demais tipos apresentam tropismo cutâneo. ⁽¹²⁾

Há uma associação entre infecção pelos Alfa-PVs oncogênicos e lesões pré-malignas e malignas do trato genital, ânus e reto. Estudos epidemiológicos mostram a presença de infecção pelos Alfa-PVs em até 93% dos carcinomas de células escamosas do canal anal. ⁽¹³⁾ O HPV pode permanecer alojado no núcleo das células epiteliais basais por décadas após a infecção inicial da mucosa; que em geral ocorre pela via sexual. ⁽¹⁴⁾

Os genótipos do HPV de alto risco (16 e 18) codificam pelo menos 3 oncoproteínas com propriedades transformadoras e estimuladoras do crescimento (E5, E6 e E7), sendo a integração do DNA do HPV viral ao cromossomo da célula hospedeira importante para a

progressão da lesão intra-epitelial pré-neoplásica para carcinoma invasivo (Figura 2).^(8, 10)

Durante a integração do DNA do HPV nas células infectadas ocorre quebra da região E2 do genoma viral, o que ocasiona a perda da função supressora da proteína E2. O consequente aumento da expressão das proteínas E6 e E7 promove estímulo à invasividade e imortalização de queratinócitos.⁽¹⁵⁾ A proteína E5 possui localização transmembrana e pode induzir dimerização ligante-independente com ativação de receptores de tirosina quinase, incluindo o *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*. A proteína E5 pode contribuir nas fases iniciais da carcinogênese, mas não é fundamental para progressão neoplásica nem para manutenção de fenótipo alterado.⁽¹⁴⁾

A expressão de E6 e E7 é necessária para a indução e manutenção do estado transformado das neoplasias associadas ao HPV. A proteína E7 forma complexos com a pRb e a proteína E6 é capaz de se ligar e inativar a proteína p53.⁽¹⁵⁾ Em linhagens celulares de câncer cervical a extinção das proteínas E6 e E7 foi capaz de promover parada do crescimento, senescência e apoptose.⁽¹⁴⁾

Fonte: Adaptado de Surg Oncol Clin N Am. 2017 Jan;26(1):57-71. Hoff et al, Pathology of Anal Cancer. 2017. Usado com a permissão de Elsevier ⁽⁸⁾

Figura 3 - História natural da infecção persistente por HPV e progressão do tecido normal para neoplasia. Mudanças no epitélio escamoso, com perda progressiva do mecanismo celular normal de apoptose. No carcinoma de células escamosas ocorre integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira. A perda da região regulatória E2 leva a produção descontrolada das oncoproteínas E6 e E7 com consequente inativação de p53 e de pRb

Imunossupressão

Indivíduos imunossuprimidos têm risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de canal anal. Foi observado risco 5 vezes maior de CEC de canal anal em transplantados; sendo o grupo de maior

risco o de pacientes que realizaram o procedimento há mais de 5 anos e que utilizaram ciclosporina ou azatioprina.⁽¹⁶⁾

A presença de infecção e imunossupressão pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de canal anal. Em estudo populacional que avaliou 4.993 pacientes portadores de HIV, a incidência de câncer de canal foi 80 vezes maior em relação a população geral.⁽¹⁷⁾

Tabagismo

Pacientes tabagistas têm risco aumentado para o desenvolvimento de infecção persistente por HPV⁽¹⁸⁾, estudos demonstraram que a exposição ao tabaco reduz a capacidade de *clearance* do HPV na região anal e essa relação é diretamente proporcional à carga tabágica.⁽¹⁹⁾

1.5 Tratamento da doença localizada

Até a década de 70 o tratamento do câncer de canal anal consistia em ressecção abdominoperineal, sendo esta uma cirurgia mutiladora, com amputação do reto e ânus associada à remoção da drenagem linfonodal e confecção de colostomia permanente; com sobrevida em 5 anos de 40% a 70%.⁽²⁰⁾

Em 1974, Nigro publicou o primeiro estudo envolvendo terapia combinada no tratamento do câncer de canal anal.⁽²¹⁾ Em 1983, reportou uma série de 28 pacientes tratados com 30 Gy de radioterapia, por 3 semanas, associada a 5-fluoracil (5-FU) 1000 mg/m²/dia em infusão contínua no dias 1 a 4 e 29 a 32 e dose única de mitomicina 15 mg/m² no D1 de tratamento. Foram incluídos 28 pacientes, dos quais 12 foram submetidos à ressecção abdominoperineal 4-6 semanas após a quimio-radioterapia (QRT); com resposta patológica completa em 58% dos casos. Os 16 casos não operados evoluíram com resposta clínica completa.⁽²³⁾ A partir de então, QRT se tornou o tratamento padrão para pacientes com câncer de canal anal localizado.

A taxa de sobrevida livre de doença nos pacientes tratados com QRT varia de acordo com alguns fatores clínicos conhecidos, como o estadiamento inicial, sendo a sobrevida em 5 anos reportada de 80% nos pacientes com doença localizada e de aproximadamente 60% nos pacientes com acometimento linfonodal regional.⁽²²⁾

Diversos estudos posteriores ao advento do esquema Nigro avaliaram variações na quimioterapia utilizada durante a concomitância com a radioterapia, assim como o uso de quimioterapia de indução e manutenção. Nenhum trabalho conseguiu demonstrar superioridade ao esquema clássico e desde a publicação dos resultados obtidos por

Nigro ⁽²³⁾, o tratamento padrão do câncer do canal anal permanece a QRT com mitomicina e 5-FU. O tratamento cirúrgico é reservado atualmente apenas aos casos de falha a essa abordagem multimodal.

Tratamento com radioterapia isolada

O estudo ACT (*Anal Cancer Trial*) I avaliou 585 pacientes e comparou o tratamento com radioterapia isolada ao tratamento combinado com quimioterapia com mitomicina e 5-FU concomitante à radioterapia. Não houve diferença em sobrevida global, entretanto, o grupo que realizou tratamento combinado apresentou redução de 46% em recorrência local e redução de 29% no risco de morte por câncer de canal anal. ⁽²⁴⁾

Tratamento com radioterapia concomitante a 5-FU isolado

O estudo RTOG (*Radiation Therapy Oncology Group*) 87-04 incluiu 310 pacientes e randomizou pacientes para tratamento com radioterapia associada a 5-FU 1000 mg/m² D1-4 ou radioterapia associada a 5-FU 1000 mg/m² D1-4 e mitomicina 10 mg/m² D1 e D29. O braço de tratamento que recebeu mitomicina apresentou menor taxa de colostomia nos pacientes com tumores T3 e T4, maior sobrevida livre de colostomia em 4 anos (71 vs. 59%) e maior sobrevida livre de

progressão em 4 anos (73% vs. 51%). Não houve diferença em sobrevida global ⁽²⁵⁾.

Substituição da mitomicina por cisplatina, quimioterapia de indução e manutenção

No estudo randomizado ACCORD (*Action Clinique Coordonnées en cancérologie Digestive*)-03, os pacientes que realizaram quimioterapia de indução, seguida de radioterapia com cisplatina 80 mg/m² D1 e D29 associada a 5-FU 800 mg/m² D1-4 e D29-32, apresentaram sobrevida livre de colostomia (76,5% vs. 75%) e sobrevida global (74,5 vs. 71%) semelhantes ao grupo que não realizou neoadjuvância. ⁽²⁶⁾

O estudo RTOG 98-11 avaliou o uso de 2 ciclos neoadjuvantes de cisplatina 75 mg/m² e 5-FU a cada 28 dias seguido do tratamento definitivo com radioterapia concomitante à cisplatina e 5-FU. Esse braço experimental foi comparado ao tratamento padrão com radioterapia concomitante à mitomicina 12 mg/m² no D1 e 5-FU infusional. O braço experimental apresentou pior sobrevida global em 5 anos (78,3% vs. 70%, p=0,026), possivelmente devido ao atraso no tratamento curativo pelo uso de neoadjuvância. ⁽²⁷⁾

O estudo ACT II incluiu 940 pacientes e, além de avaliar a substituição da mitomicina por cisplatina durante o tratamento definitivo com QRT, também estudou o uso de quimioterapia de manutenção após o término do tratamento definitivo. Os pacientes foram tratados com radioterapia concomitante à mitomicina 12 mg/m^2 D1 e 5-FU 1.000 mg/m^2 D1–4 e D29–32 ou cisplatina 60 mg/m^2 D1 e D29 e 5-FU 1.000 mg/m^2 D1–4 e D29–32. Após o término do tratamento os pacientes foram randomizados para realizar ou não realizar quimioterapia de manutenção com mais dois ciclos de cisplatina 60 mg/m^2 e 5-FU 1.000 mg/m^2 . Não houve diferença em sobrevida livre de colostomia ou sobrevida global entre os braços de tratamento.⁽²⁸⁾

Dessa forma, não foi evidenciada superioridade do tratamento com cisplatina. Pelos resultados semelhantes aos do braço da mitomicina no estudo ACT-II, a cisplatina pode ser uma alternativa de tratamento na indisponibilidade da mitomicina ou na presença de contra indicações ao seu uso. Não foi estabelecido benefício no uso de quimioterapia de indução ou de manutenção no tratamento dos pacientes com câncer de canal anal localizado.

Substituição do 5-FU por capecitabina

Depois da administração oral, a capecitabina é absorvida no trato gastrointestinal e é convertida em 5-FU por uma cascata enzimática em três fases. A primeira é a conversão da capecitabina em 5'-deoxy-5-fluorocitidina pela carboxilesterase, enzima localizada no fígado. Posteriormente, a 5'-deoxy-5-fluorocitidina é convertida em 5'-deoxy-5-fluorouridina pela citidina deaminase presente no fígado e no tecido tumoral. A última conversão, de 5'-deoxy-5-fluorocitidina para 5-FU, é catalisada pela timidina fosforilase, que está presente em maiores concentrações no tecido tumoral do que em tecidos normais. ⁽²⁹⁾

Estudo fase 2 e metanálise, conduzidos pelo nosso grupo no ICESP, demonstraram que a substituição do 5-FU infusional por capecitabina no tratamento do câncer de canal anal é uma opção aceitável. ⁽³⁰⁾ No estudo de fase 2, que incluiu 51 pacientes, foi obtido controle locorregional de doença em 86% dos pacientes 6 meses após o tratamento, com boa tolerabilidade e segurança. ⁽³¹⁾ A substituição do 5-FU infusional por capecitabina também é contemplada em diretrizes internacionais de tratamento. ⁽³²⁾

Com essa adaptação, os pacientes podem realizar o tratamento sem a necessidade de internação hospitalar para quimioterapia infusional ou colocação de cateter central/bomba de infusão.

1.6 Câncer de canal anal metastático

Quanto mais precoce for o diagnóstico, melhor o prognóstico dos pacientes com câncer de canal anal. ⁽²²⁾ Na presença de doença metastática o prognóstico é ruim e, devido à raridade da doença, não existem estudos randomizados de fase III para o tratamento da doença estadio IV. Séries de caso relatam sobrevida livre de progressão de 5 meses e sobrevida global mediana de 17 meses, nos pacientes tratados apenas com quimioterapia com intuito paliativo. ⁽³³⁾

O esquema de tratamento mais utilizado na doença metastática envolve o uso de cisplatina associada à 5-FU. ⁽³³⁾ Recentemente, estudo de fase 2 demonstrou atividade da imunoterapia em pacientes metastáticos refratários à quimioterapia. ⁽³⁴⁾

1.7 Biomarcadores no câncer de canal anal

Apesar da alta taxa de cura com QRT, um subgrupo de pacientes com câncer de canal anal localizado apresenta progressão de doença logo após o término do tratamento. Na análise de 691 pacientes incluídos no estudo ACT II, 15% não apresentou resposta completa após 26 semanas do início do tratamento. A sobrevida global em 5 anos desse grupo de

pacientes foi de 48%, em contraste com 87% no grupo de pacientes com resposta clínica completa após 26 semanas do início do tratamento.⁽³⁵⁾ O estadió clínico é atualmente o fator prognóstico mais bem estabelecido no câncer de canal anal com pior sobrevida nos pacientes com tumores T3 e T4 e/ou com acometimento linfonodal.^(22, 36) Entretanto, apenas o estadió não é capaz de justificar todos os casos de resistência primária ao tratamento.

Atualmente, a literatura não é capaz de responder se algum biomarcador é capaz de prever resposta, ao tratamento com QRT, nos pacientes com câncer de canal anal localizado.

O vírus HPV tem um papel importante no desenvolvimento do carcinoma epidermóide em vários sítios primários como cabeça e pescoço, pênis, colo uterino, vulva e canal anal. Em pacientes com tumor de orofaringe o HPV é um fator prognóstico independente para sobrevida e resposta tumoral ao tratamento. A sobrevida em 3 anos dos pacientes com tumor de orofaringe HPV positivo (HPV+) é de 82,4% vs. 57,1% nos pacientes HPV negativo (HPV-).⁽³⁷⁾ Em estudo retrospectivo da influência do HPV no desfecho dos pacientes com câncer de canal anal realizado por Mai⁽³⁸⁾, em 106 pacientes com câncer de canal anal, com estadió I a IV, a presença de HPV e expressão de p16 foi associada

a melhor controle local em 5 anos, sendo o HPV um potencial marcador de resposta no câncer de canal anal.

Tem sido demonstrado que a infecção por HPV leva a aumento de dano ao DNA celular e de mutações endógenas, sendo a instabilidade genômica importante no processo de transformação celular.⁽³⁹⁾ A expressão de E6/E7 pode ativar a via da *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha)/AKT/mTOR.⁽³⁹⁾ Descoberta na década de 1980, a família de enzimas diméricas de lipídeo quinases, chamada fosfoinositídeo 3-quinases (PI3Ks), participa da regulação de funções celulares como sobrevivência, proliferação e diferenciação.⁽⁴⁰⁾

Mutações no gene *PIK3CA* têm sido relacionadas à presença de infecção pelo vírus HPV em tumores cervicais e de orofaringe,⁽⁴¹⁾ sendo também descrita a hiperativação desta via através da interação do receptor de *EGFR* com a proteínas E5 e E6 produzidas pelo vírus HPV16.

A análise de DNA proveniente de 70 tumores de canal anal, sendo a maioria dos pacientes estadio IV, mostrou alterações em *PIK3CA* em 40% dos casos, sendo prevalentes mutações do tipo *missense* patogênicas (*E542K*, *E545K*, *Q546K*, *H1047L*, *H1047R*).⁽⁴²⁾ As mutações não foram relacionadas ao estadio da doença, o que pode

sugerir que essa alteração molecular seja um evento precoce no tumor de canal anal.⁽⁴²⁾ Em outro estudo com 38 pacientes com progressão de doença após QRT e submetidos a amputação abdominoperineal, a presença de mutação em *PIK3CA* foi um marcador de pior sobrevida global em análise multivariada (HR=3,7; IC95%=1,1-11,7; p=0,025).⁽⁴³⁾

A presença de infecção por HPV e câncer de canal anal é maior em pacientes imunocomprometidos. A resposta imune mediada contra o vírus HPV e também contra o próprio tumor envolve células T, citocinas regulatórias e *checkpoints* imunológicos, que controlam a ativação das células T.⁽⁴⁴⁾ O funcionamento do sistema imune humano durante a interação entre HPV, HIV e as células tumorais ainda não é totalmente conhecido. Pacientes portadores de HIV (HIV+) podem apresentar diferente resposta tumoral ao tratamento com QRT, quando comparados aos não portadores do vírus (HIV-). Grew⁽⁴⁵⁾ avaliou 105 pacientes, sendo 37 HIV+. A sobrevida global em 3 anos foi de 42% no grupo HIV+ e de 76% entre os pacientes HIV- (HR=2,3; IC95%=1,03-5,28; p=0,037). Entretanto, outros estudos retrospectivos mostram taxa de resposta de 86%, semelhante aos controles históricos em populações HIV-.⁽⁴⁶⁾ A presença do vírus HIV foi critério de exclusão nos estudos prospectivos randomizados de fase III, envolvendo pacientes com câncer

de canal anal localizado e, portanto, não existem dados prospectivos de resposta a QRT nessa população.

Atualmente a imunoterapia tem se mostrado promissora no tratamento de pacientes com câncer de canal anal metastático.⁽³⁴⁾ Yanik⁽⁴⁷⁾ publicou série com avaliação de expressão tumoral de PD-L1 em 40 pacientes, sendo 23 HIV+. Aproximadamente metade das amostras apresentou expressão de PD-L1, independente do status HIV. Ainda permanece desconhecido se os *checkpoints* imunológicos permanecem totalmente ativos, em pacientes cronicamente imunossuprimidos, e se possuem alguma influência na resposta ao tratamento do câncer de canal anal com QRT.

O Ki-67 (*Antigen Identified by Monoclonal Antibody Ki-67*) é um marcador de proliferação celular, considerando que as células em G0 não expressam Ki-67.⁽⁴⁸⁾ Em revisão sistemática de 29 estudos utilizando marcadores por imunoistoquímica e radioimunoensaio em câncer de canal anal, o alto índice de Ki-67 foi associado à maior sobrevida livre de doença.⁽⁴⁸⁾

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Devido à raridade do câncer de canal anal e da consequente dificuldade de recrutamento para realização de estudos prospectivos, os dados atualmente disponíveis são provenientes de estudos retrospectivos. Esses estudos apresentam muitas limitações, entre elas o *status* HIV e a resposta tumoral não avaliados de forma sistemática, os tratamentos recebidos pelos pacientes nem sempre padronizados, ausência de protocolo de seguimento e amostra tumoral coletada em vários sítios de doença e/ou em momentos diferentes do tratamento oncológico.

Paralelamente, não conhecemos estudos prospectivos que tenham avaliado o impacto de biomarcadores (HIV, HPV, Ki-67, PD-L1 e a presença de mutações no DNA tumoral) na resposta ao tratamento após QRT em pacientes com câncer de canal anal localizado.

Através da identificação precoce de tumores refratários ao tratamento convencional com QRT, podem ser propostas recomendações de seguimento diferenciado para os subgrupos com maior chance de falha terapêutica.

O conhecimento do perfil molecular do câncer de canal anal também pode possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias para combate à doença, baseadas em terapias-alvo.

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 Objetivo primário

O objetivo primário deste estudo foi identificar biomarcadores que poderiam influenciar a resposta completa ao tratamento aos 6 meses após o término da QRT. Os biomarcadores pesquisados foram *status* HIV, HPV, expressão de PD-L1, Ki-67 e mutações presentes no DNA tumoral.

3.2 Objetivos secundários

Os objetivos secundários incluíram a associação dos biomarcadores com a resposta completa e/ou parcial ao tratamento aos 6 meses após o término da QRT e com sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG).

Também foram realizadas análises exploratórias a respeito da taxa de resposta em 6-8 semanas, toxicidades ao tratamento e desfechos clínicos de acordo com HIV, expressão de PD-L1 e Ki-67 e perfil molecular do DNA tumoral.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectivo de braço único.

4.2 Desfechos

O desfecho primário foi resposta completa aos 6 meses após o término do tratamento, que foi mensurada pelos Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST) v1.1.⁽⁴⁹⁾

A sobrevida livre de progressão foi determinada por RECIST 1.1 e definida pela diferença entre a data da progressão e a data da primeira dose de tratamento.

A sobrevida global foi definida pela diferença entre a data de óbito e a data da primeira dose de tratamento. Perda de seguimento foi considerada censura na análise dos eventos.

Os pacientes permaneceram em acompanhamento clínico a cada 3 meses nos primeiros 2 anos e semestralmente do terceiro ao quinto ano de seguimento. Exames de imagem (tomografia de tórax e abdome, tomografia ou ressonância de pelve) foram realizados com frequência

anual do primeiro ao quinto ano de seguimento, conforme rotina institucional.

4.3 Critérios de seleção dos pacientes

Os pacientes foram recrutados do ambulatório de oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Os pacientes elegíveis deveriam preencher todos os critérios de inclusão e nenhum de exclusão.

4.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma de células escamosas do canal anal invasivo, realizado através de biopsia.
- Estadiamento T2-4 N0 M0, qualquer T N1-3, M0 de acordo com os critérios do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) VII edição (Anexos 1 e 2).⁽⁵⁰⁾
- Pacientes candidatos a tratamento curativo com QRT de acordo com rotina institucional.
- Foram incluídos pacientes até 5 meses após o término do tratamento. Foram definidos 5 meses para que houvesse acesso

prospectivo à avaliação de resposta radiológica 6 meses pós tratamento.

- Pacientes com biópsia tumoral em bloco de parafina.
- Idade ≥ 18 anos.
- Termo de consentimento livre e esclarecido, assinado e datado, indicando que o paciente (ou representante legal) foi informado e compreendeu todos os aspectos pertinentes do estudo antes da inclusão.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com doença metastática.
- Pacientes com co-morbidades graves para realização do protocolo de QRT completo conforme o padrão institucional.

4.4 Metodologia

4.4.1 Acompanhamento clínico e tratamento oncológico e avaliação de toxicidade dos pacientes

Todos os pacientes incluídos no estudo realizaram sorologia para HIV antes do início do tratamento. Como tratamento receberam

radioterapia associada a uma dose de mitomicina e, conforme escolha do investigador, 5-FU infusional ou capecitabina via oral.

Os pacientes tratados com 5-FU receberam mitomicina 15 mg/m² no D1 de tratamento associado à infusão contínua de 5-FU 1.000 mg/m² em 24h no D1-4 e D29-32 em regime de internação hospitalar. Os pacientes receberam radioterapia de 45 à 59 Gy divididos em 28-30 frações.

Os pacientes tratados com capecitabina ambulatorialmente receberam no D1 de tratamento uma dose de mitomicina de 15 mg/m² via endovenosa e capecitabina 825 mg via oral 12/12h de segunda a sexta feira, durante o período de radioterapia. Os pacientes receberam radioterapia de 45 à 59 Gy divididos em 28-30 frações.

O estudo do RTOG 92-08 sugere que interrupções no curso de radioterapia podem estar associadas à maior taxa de recorrência local e à distância. ⁽⁵¹⁾ O tratamento dos pacientes foi monitorado e foi considerada interrupção significativa no tratamento uma pausa maior que 7 dias na radioterapia ou não ter completado 100% do esquema de quimioterapia previsto.

Com objetivo de avaliação de eficácia, os pacientes foram avaliados clinicamente e radiologicamente 6-8 semanas e 6 meses após o término do tratamento. Ao atingir resposta completa permaneceram em

acompanhamento clínico a cada 3 meses nos primeiros 2 anos e semestralmente do terceiro ao quinto ano de seguimento. Exames de imagem (tomografia de tórax e abdome, tomografia ou ressonância de pelve) foram realizados com frequência anual do primeiro ao quinto ano de seguimento.

As toxicidades clínicas e laboratoriais foram acompanhadas e classificadas utilizando os critérios de terminologia comum para eventos adversos versão v3.0.⁽⁵²⁾ Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica semanal no tratamento ambulatorial com capecitabina. Quando em tratamento com 5-FU infusional, foram avaliados pré D1 e pré D29 e também diariamente durante os períodos de internação. Os pacientes realizaram pelo menos duas coletas de exames laboratoriais durante o tratamento. Todos os pacientes foram avaliados para toxicidade a partir do D1 e até 30 dias após o último dia de QRT.

4.4.2 Método de estadiamento e avaliação de resposta radiológica ao tratamento

O estadiamento inicial dos pacientes foi realizado, conforme rotina institucional, com exame de tomografia de tórax, tomografia de abdome e tomografia ou ressonância de pelve. Sempre que possível foi utilizada a combinação de tomografia de tórax/abdome e ressonância de pelve.

A resposta ao tratamento com QRT foi verificada de forma prospectiva 6 meses após o tratamento por RECIST versão 1.1.⁽⁴⁹⁾ Foram realizados exames de imagem (tomografia de tórax, tomografia de abdome e tomografia ou ressonância de pelve) e avaliação clínica da região anal; sempre utilizando os mesmos métodos realizados nos exames de estadiamento inicial. Pacientes que realizaram exames 6-8 semanas após o tratamento também tiveram suas imagens avaliadas por RECIST. Todos os exames de imagem foram revisados por um único radiologista, especialista em tumores de reto e ânus.

As definições para mensuração de doença e avaliação de resposta, conforme os critérios de RECIST v1.1⁽⁴⁹⁾, foram:

Doença mensurável

Lesões mensuráveis foram definidas como aquelas que podem ser precisamente medidas em ao menos uma dimensão (diâmetro mais longo a ser registrado) > 10 mm em CT ou RNM. O mesmo método de avaliação e a mesma técnica foi utilizada para caracterizar cada lesão identificada e relatada no exame basal e durante o acompanhamento.

Lesões alvo

Todas as lesões mensuráveis até no máximo duas lesões por órgão e cinco lesões na representação total de todos os órgãos envolvidos foram identificadas como lesões alvo e registradas nos exames basais. As lesões alvo foram selecionadas com base em seu tamanho (lesões com os diâmetros mais longos) e sua adequação para medições repetidas precisas. A soma dos maiores diâmetros de todas as lesões alvo foi calculada e relatada nos exames basais.

Resposta completa (RC)

Desaparecimento de todas as evidências clínicas e radiológicas de tumor (alvo ou não alvo).

Resposta parcial (RP)

Uma redução de pelo menos 30% na soma dos maiores diâmetros de lesões alvo, tendo como referência o exame basal.

Progressão de doença (PD)

Um aumento de pelo menos 20% na soma dos maiores diâmetros das lesões medidas tendo como referência a menor soma dos maiores diâmetros registrada desde o início do tratamento. O aparecimento de

novas lesões também constituiu doença progressiva. Em circunstâncias excepcionais, progressão evidente de lesões não alvo foi aceita como progressão da doença.

Doença estável (DE)

Estado de equilíbrio da doença. Nem redução suficiente para qualificar como RP nem aumento suficiente para qualificar como PD.

4.4.3 Avaliação histológica das amostras de tecido tumoral e extração de DNA

Todas as biopsias do tumor foram realizadas antes do início do tratamento oncológico. As lâminas histológicas foram avaliadas por um patologista molecular quanto à adequabilidade do material e para definição da área a ser utilizada para extração de DNA. Também foi determinada a porcentagem de células neoplásicas no fragmento, sendo considerado satisfatório o mínimo de 20%. Nos casos com % de tecido tumoral entre 20 e 30% foi realizada microdissecção com lupa.

As amostras teciduais em bloco de parafina foram cortadas em secções de 5 µm e colocadas em lâminas de vidro ou secções de 10 µm colocadas em tubos de 1,5 mLs. A extração de DNA foi realizada com o kit Maxwell® FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega Catálogo

AS 1135), seguindo as orientações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por fluorimetria através do reagente Qubit DSDNA HS Assay (Invitrogen Catálogo Q32854).

4.4.3.1 Protocolo de avaliação de integridade da amostra

O DNA extraído foi avaliado quanto à sua integridade por meio de uma PCR quantitativa em tempo real, através da comparação da amplificação do DNA da amostra em relação ao DNA referência. Foram utilizados *primers* específicos incluídos no kit de avaliação de mutações por sequenciamento de segunda geração (TruSight Tumor 26 - Illumina®) e seguindo as orientações do fabricante. Cada amostra foi analisada em triplicata e o valor médio de Ct obtido foi subtraído do valor médio obtido na amostra controle (ΔCq). Foram sequenciadas amostras que apresentaram ΔCq abaixo de 10.

4.4.3.2 Análise de mutações por sequenciamento de segunda geração

Para avaliação da presença de mutações foi utilizado o painel TruSight Tumor 26 (Illumina® Catálogo FC-130-2001), conforme orientação do fabricante. O kit faz o sequenciamento seletivo de éxons

de 26 genes (Tabela 1) envolvidos no processo de carcinogênese (174 amplicons).

O preparo da biblioteca foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Este protocolo envolveu uma etapa de hibridização, no DNA genômico, de oligonucleotídeos específicos para cada região pesquisada no painel. Em seguida, os oligonucleotídeos não hibridizados no DNA genômico foram removidos através de um processo de filtração. Os oligonucleotídeos hibridizados foram ligados através de uma reação de extensão e ligação. Na etapa de extensão, a enzima DNA polimerase estende a fita de DNA a partir do oligonucleotido hibridizado na região 5' (upstream) e em seguida a enzima DNA ligase liga o DNA com o oligonucleotídeo hibridizado na região 3' (downstream). Finalmente, o DNA resultante foi amplificado, utilizando oligonucleotídeos acoplados com sequências específicas para identificar cada amostra e com sequências adaptadoras necessárias para a geração de clusters na etapa de sequenciamento.

A identificação de variantes foi realizada utilizando parâmetros específicos do software VariantStudio versão 2.2 Amplicon DS Workflow, definidos pelo fabricante do kit TruSight Tumor 26 Illumina®. As duas fitas de DNA foram analisadas em dois *amplicons* distintos, para avaliar a fita senso e antisenso do DNA. Somente as

variantes presentes em ambos foram identificadas. As sequências encontradas foram comparadas com a sequência referência do genoma humano (versão GRCh37/hg19) e foram identificadas somente variantes com qualidade superior a Q20. Para a análise, foi considerado um mínimo de 1.000x de cobertura de cada alelo e frequência do alelo variante superior a 5%. A sensibilidade e especificidade analítica do teste é de 99,9%.⁽⁵³⁾

Tabela 1 - Cobertura de sequenciamento genético pelo painel TruSight Tumor 26 Illumina®

Gene	Exon(s)
<i>AKT1</i>	2
<i>ALK</i>	23
<i>APC</i>	15
<i>BRAF</i>	11,15
<i>CDH1</i>	8,9,12
<i>CTNNB1</i>	2
<i>EGFR</i>	18,19,20,21
<i>ERBB2</i>	20
<i>FBXW7</i>	7,8,9,10,11
<i>FGFR2</i>	6
<i>FOXL2</i>	1
<i>GNAS</i>	6 e 8
<i>GNAQ</i>	4,5,6
<i>KIT</i>	9,11,13,17,18
<i>KRAS</i>	1,2,3,4
<i>MAP2K1</i>	2
<i>MET</i>	2,5,14,16,17,18,19,21
<i>MSH6</i>	5
<i>NRAS</i>	1,2,3,4
<i>PDGFRA</i>	12, 14, 18
<i>PIK3CA</i>	1,2,7,9,20
<i>PTEN</i>	1,2,3,4,5,6,7,9
<i>SMAD4</i>	8,11
<i>SCR</i>	10
<i>STK11</i>	1,4,6,8
<i>TP53</i>	2 a 11

Também foi realizada pesquisa manual nos bancos de dados *on line*: *cBioPortal for cancer genomics*,⁽⁵⁴⁾ *On line Mendelian Inheritance in Man*®,⁽⁵⁵⁾ *Exome Aggregation Consortium*,⁽⁵⁶⁾ *Clinitae*⁽⁵⁷⁾ e *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*⁽⁵⁸⁾.

As variantes, que previamente haviam sido descritas como benignas nesses bancos de dados e/ou não tinham relação com HPV, foram excluídas das análises de associação com resposta ao tratamento.

4.4.3.3 Pesquisa de HPV

A pesquisa de HPV foi realizada por meio do kit diagnóstico PapilloCheck® (Greiner Bio-One GmbH). Esse método permite a identificação de 18 tipos de HPV de alto risco e seis tipos de HPV de baixo risco (Tabela 2).

PapilloCheck® é um teste baseado em tecnologia de *microarray* para a detecção e genotipagem de um fragmento do gene E1 do genoma do papilomavírus humano. Esse teste realiza genotipagem do papilomavírus humano tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82.

Antes da análise do *PapilloCheck®*, o DNA foi extraído das amostras conforme descrito acima. Após a extração do DNA genômico humano e viral das amostras, a análise de HPV foi realizada conforme a orientação do fabricante. O fragmento de 350 bp do gene viral E1 é amplificado por uma reação em cadeia da polimerase (PCR) na presença de um conjunto de *primers* específicos para HPV e marcados por fluorescência. Na mesma reação, um fragmento do gene humano *ADAT1*

de cópia simples (deaminase-1 adenosina tRNA-específica humana) é amplificado como controle e um template-controle interno presente no *PapilloCheck® PCR MasterMix* é amplificado para monitorar o desempenho da PCR. Os produtos de PCR são então hibridizados com sondas DNA específica e controles *on-chip* ligados à superfície do chip *PapilloCheck®*. Após a hibridização, o DNA não ligado é removido nas etapas de lavagem subsequentes. A eficiência da hibridização é monitorada através de controle de hibridização.

Após a hibridização o chip *PapilloCheck®* é escaneado, analisado e avaliado automaticamente usando o *CheckScanner™* e *CheckReport™ Software*, respectivamente. O *CheckScanner™* é um scanner a laser bicolor (comprimento de onda de excitação 532 nm e 635 nm) que possibilita a detecção do sinal de fluorescência gerado pela presença do produto de amplificação específicos de HPV bem como os controles. O *CheckReport™ Software* possibilita a visualização, análise e avaliação dos resultados e apresenta automaticamente os valores correspondentes tanto dos tipos de HPV detectados como dos controles em um relatório detalhado. O relatório indica claramente a presença ou ausência de um ou mais dos 24 tipos de HPV detectáveis e os controles abrangentes no *chip* tornam a análise altamente confiável. A sensibilidade clínica do

teste é de 95,8% e a especificidade de 96,7% em pacientes com neoplasia intraepitelial de alto grau de colo uterino.⁽⁵⁹⁾

Nos casos onde o controle interno da amostra foi negativo na metodologia acima, foi realizada pesquisa de HPV por hibridização *in situ*. Novos cortes histológicos de 5 µm foram submetidos à reação de hibridização com as sondas INFORM HPV III Family 16 Probe e INFORM HPV II Family 6 Probe (Ventana) no equipamento Benchmark Ultra (Ventana) conforme orientações do fabricante. Essas sondas possuem como alvo tipos de HPV de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 66) e baixo risco (HPV 6 e 11). Esse teste não especifica o tipo do HPV, apenas gera um resultado positivo ou negativo. A interpretação dos resultados obtidos em cada amostra foi realizada por um médico patologista. A presença de DNA de HPV, tanto na forma epissomal como na integrada no genoma humano, é evidenciada por coloração intensa e típica no núcleo das células epiteliais.

Tabela 2 - Tipos de HPV investigados

HPV 16	HPV 45	HPV 59	HPV 6
HPV 18	HPV 51	HPV 66	HPV 11
HPV 31	HPV 52	HPV 68	HPV 40
HPV 33	HPV 53	HPV 70	HPV 42
HPV 35	HPV 56	HPV 73	HPV 43
HPV 39	HPV 58	HPV 82	HPV 44/ HPV55*

Tabela 2: Tipos de HPV Detectáveis com PapilloCheck. * PapilloCheck® não permite a diferenciação entre o HPV 44 e o HPV 55. Em negrito os tipos de alto risco pesquisados pelo método.

4.4.3.4 Pesquisa de Ki-67

As reações de imunoistoquímica para avaliação da proteína Ki-67 foram realizadas por técnica automatizada em cortes parafinados. As lâminas contendo as amostras tumorais foram desparafinizadas com subsequente recuperação antigênica, por calor úmido, seguida por bloqueio da peroxidase endógena em tampão *Cell Conditioning Solution* (Ventana®) e incubação com o anticorpo anti-Ki-67 (*Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67*) clone MIB-1 (DAKO®), titulado 1:200 durante 32 minutos à 37 °C. Na sequência, foi incubado com a solução do kit *Ultraview Universal DAB Detection* (Ventana®) para detecção e amplificação da reação imunoistoquímica, seguindo as orientações do fabricante. Foram considerados controles positivos os tecidos sabidamente positivos para o anticorpo específico utilizado.

4.4.3.5 PD-L1

As reações de imunoistoquímica para avaliação da proteína PD-L1 são realizadas por técnica automatizada em cortes parafinados. As lâminas contendo as amostras tumorais foram desparafinizadas com subsequente recuperação antigênica por calor úmido seguida por bloqueio da peroxidase endógena em tampão *Cell Conditioning Solution* (Ventana®) e incubação com o anticorpo anti-PD-L1 XP clone E1L3N (*Cell Signaling*), titulado 1:100 durante 32 minutos à 37 °C. Na sequência, foi incubado com a solução do kit *Ultraview Universal DAB Detection* (Ventana®) para detecção e amplificação da reação imunoistoquímica, seguindo as orientações do fabricante. Foram considerados controles positivos os tecidos sabidamente positivos para o anticorpo específico utilizado. Foi avaliada expressão nas células tumorais e também no infiltrado linfocitário peritumoral. Foi considerada expressão positiva quando pelo menos 1% das células expressavam PD-L1.

4.5 Considerações estatísticas

Devido à raridade da doença e ausência de dados na literatura quanto à frequência de mutações em pacientes com CEC de canal anal,

na ocasião do desenho do estudo, foi estimado um tamanho de amostra de conveniência de 70 pacientes. Esse número foi escolhido baseado em factibilidade e número de casos tratados no serviço mensalmente.

Estatística descritiva foi usada para as características da população estudada e a frequência das alterações nos biomarcadores. Análises de associação entre biomarcadores e desfecho clínico foram avaliadas através do teste exato de Fisher ou regressão logística multivariada.

Regressão logística multivariada para resposta completa aos 6 meses foi planejada, considerando as variáveis independentes: status HIV, estadio, idade, Ki-67, PD-L1, HPV e interrupção significativa do tratamento. Os testes de hipótese foram bicaudais com nível de significância de 5%. Os resultados das comparações entre grupos foram expressos através de OR (Odds Ratio) e o intervalo de confiança de 95%.

4.6 Aspectos éticos

Todos os pacientes foram informados sobre as intenções do estudo. Eles foram informados sobre a confidencialidade de seus dados e que seus registros médicos poderiam ser revisados, para fins do estudo, por pessoas autorizadas.

A participação dos pacientes foi voluntária e o paciente teve o direito de se recusar a participar, sempre que desejou. Isso não prejudicou o cuidado subsequente ao paciente.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3) documentado foi obtido de todos os pacientes incluídos neste estudo, antes que eles fossem registrados no estudo, de acordo com os requisitos regulatórios locais.

Este estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque ⁽⁶⁰⁾ e de acordo com as Diretrizes Tripartidas da Conferência Internacional de Harmonização para as Boas Práticas Clínicas ⁽⁶¹⁾.

Este estudo foi aprovado para execução pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Anexo 4) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina em da Universidade de São Paulo, como protocolo de pesquisa n° 362/11 em 28/09/2011 (Anexo 5). Também foi aprovada emenda, referente às atualizações do projeto em 08/03/2017 - MM1200/16 (Anexo 6).

4.7 Financiamento

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [2013/03093-0], sob responsabilidade da Dra. Renata Almeida Coudry.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Recrutamento e características da população incluída

Foram recrutados 78 pacientes de outubro/2011 até dezembro/2015. Foram excluídos três pacientes para análise de associação com desfecho de resposta ao tratamento: dois por apresentar doença metastática na revisão dos exames de imagem e um por abandono de protocolo. Dois destes pacientes entregaram a biopsia tumoral. Setenta e cinco pacientes realizaram avaliação de resposta aos 6 meses após o tratamento e destes 68 entregaram a biopsia tumoral, realizada antes do início do tratamento, para ser avaliada durante o estudo (Figura 4).

Figura 4 - Recrutamento

Quanto às características dos 75 casos estudados, a idade mediana foi de 57 anos, com predomínio de pacientes do sexo feminino em 72% (n = 54). Os pacientes apresentavam bom *performance status*, 93,3% com ECOG 0 ou 1. Infecção por HIV foi detectada em 12% (n = 9) e 65% (n = 49) apresentou estadio III ao diagnóstico (Tabela 3).

Tabela 3 - Características da população (n=75)

Característica	n	(%)
Sexo		
Feminino	54	72
Masculino	21	28
HIV		
Positivo	9	12
Negativo	66	88
ECOG		
0	34	45,3
1	36	48
2	4	5,3
3	1	1,4
Estadio		
II	26	34,7
IIIA	19	25,3
IIIB	30	40
Tumor Primário (T)		
T1	1	1,4
T2	31	41,3
T3	18	24
T4	25	33,3
Linfonodos Regionais (N)		
N0	35	46,7
N1	15	20
N2	18	24
N3	7	9,3
Idade Mediana (anos)	57 (38-79)	

5.2 Avaliação de resposta

Na avaliação 6-8 semanas após o tratamento 41 pacientes (54,6%) apresentaram resposta completa, 28 (37,3%) resposta parcial, dois (2,7%) doença estável e três (4%) progressão de doença. Aos 6 meses após o término da QRT, 47 (62,7%) apresentaram resposta completa, 18 (24%) resposta parcial e 10 (13,3%) progressão de doença (Tabela 4). Todos os pacientes com doença estável 6-8 semanas após a QRT evoluíram com progressão de doença aos 6 meses.

Tabela 4 - Resposta ao tratamento (n=75)

	n	(%)
Resposta em 6-8 semanas		
Reposta Parcial	28	37,3
Doença Estável	2	2,7
Resposta Completa	41	54,6
Progressão de Doença	3	4
Não avaliado	1	1,4
Resposta em 6 meses		
Reposta Parcial	18	24
Doença Estável	0	0
Resposta Completa	47	62,7
Progressão de Doença	10	13,3

Em quatro pacientes a avaliação de resposta ao tratamento foi clínica pois três pacientes não apresentavam doença inicialmente mensurável pelos critérios de RECIST v1.1 e um paciente não realizou exame de imagem aos 6 meses. Estes quatro pacientes apresentaram resposta completa sustentada por mais de dois anos.

O seguimento mediano dos 75 pacientes com avaliação de resposta aos 6 meses pós QRT é de 44 meses (10-73) e até o momento 27 pacientes apresentaram recidiva de doença. Dez pacientes tiveram progressão na avaliação aos 6 meses pós QRT, sendo os outros 17 diagnosticados durante o seguimento clínico-radiológico. Seis pacientes foram submetidos a tratamento de resgate após a recidiva e estão sem evidência de neoplasia. Sete pacientes estão atualmente em tratamento e 14 evoluíram a óbito. Os dados ainda são imaturos para avaliação da influência dos biomarcadores estudados em sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

Na avaliação de resposta 6 meses após o tratamento, entre os pacientes HIV- 44 (66,7%) apresentaram resposta completa, 15 (22,7%) resposta parcial e sete (10,6%) progressão de doença. Nos pacientes portadores de HIV, três (33,3%) apresentaram resposta completa, três (33,3%) tiveram resposta parcial e três (33,3%) progressão de doença (Tabela 5).

Entre os pacientes HIV+ a mediana de CD4 foi de 714 (134-1001), seis pacientes apresentavam antecedente de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), oito pacientes faziam uso de terapia antirretroviral e sete estavam com carga viral indetectável.

Tabela 5 - Resposta ao tratamento de acordo com *status* HIV (n=75)

	HIV+ (n=9)		HIV- (n=66)		Teste exato de Fisher
	n	(%)	n	(%)	
Resposta em 6-8 semanas					
Reposta Parcial	4	44,5	24	36,4	p=0,71
Doença Estável	1	11,1	1	1,5	P=0,2
Resposta Completa	3	33,3	38	57,6	p=0,28
Progressão de Doença	0	0	3	4,5	p=1
Não avaliado	1	11,1	0	0	-
Resposta em 6 meses					
Reposta Parcial	3	33,3	15	22,7	p=0,44
Doença Estável	0	0	0	0	-
Resposta Completa	3	33,3	44	66,7	p=0,07
Progressão de Doença	3	33,3	7	10,6	p=0,09

Na avaliação de resposta 6 meses após o tratamento, entre os pacientes ECII 84,6% apresentaram RC, RP foi observada em 11,6% e 3,8% evoluíram com PD (Tabela 6).

Tabela 6 - Resposta ao tratamento de acordo com estadiamento (n=75)

	Estadio II (n=26)		Estadio III (n=49)		Teste exato de Fisher
	n	(%)	n	(%)	
Resposta em 6-8 semanas					
Reposta Parcial	4	15,4	24	49	p= 0.0055
Doença Estável	1	3,8	1	2	p=1
Resposta Completa	21	80,8	20	40,9	p=0.0013
Progressão de Doença	0	0	3	6,1	-
Não avaliado	0	0	1	2	-
Resposta em 6 meses					
Reposta Parcial	3	11,6	15	30,6	p=0.089
Doença Estável	0	0	0	0	-
Resposta Completa	22	84,6	25	51	p=0.0055
Progressão de Doença	1	3,8	9	18,4	p=0.15

5.3 Características do tratamento oncológico

Todos os pacientes receberam 100% da dose prevista de mitomicina e 50 (66,6%) realizaram 100% do tratamento com fluoropirimidina (5-FU ou capecitabina). Todos os pacientes completaram o tratamento com radioterapia e 69 (92%) realizaram a dose 54 Gy. A maioria dos pacientes, 39 (52%), recebeu tratamento de forma ambulatorial com capecitabina e mitomicina associado à radioterapia (Tabela 7). Foi realizada radioterapia com intensidade modulada de dose em 28 pacientes e o restante foi tratada com radioterapia externa tridimensional.

Tabela 7 - Características do tratamento (n=75)

	N	%
Nigro	36	48
Mitomicina, Capecitabina e RDT	39	52
Mitomicina (100% dose)	75	100
Fluoropirimidina		
100% dose	50	66,6
50-99% dose	21	28
<50% dose	4	5,4
Radioterapia		
45 Gy	1	1,3
50.4Gy	4	5,4
54Gy	69	92
59 Gy	1	1,3

5.4 Avaliação de toxicidade

As toxicidades graus 3 e 4 mais comuns foram linfopenia em 62 pacientes (82,6%), radiodermite em 45 (60%), diarreia em dez (13,3%), neutropenia e trombocitopenia em seis (8%). Interrupção significativa no tratamento por toxicidade foi necessária em 53 pacientes (70,6%), a maioria por radiodermite (Tabela 8).

Tabela 8- Toxicidades ao tratamento

	HIV- N=66				HIV+ N=9				Todos N=75			
	G3		G4		G3		G4		G3		G4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Anemia	4	6	-	-	1	11,1	-	-	5	6,6	-	-
Neutropenia	4	6	1	1,5	1	11,1	-	-	5	6,6	1	1,4
Linfopenia	53	80,3	3	4,5	4	44,4	2	22,2	57	76	5	6,6
Plaquetopenia	4	6	1	1,5	1	11,1	-	-	5	6,6	1	1,4
Vômito	2	3	-	-	-	-	-	-	2	2,5	-	-
Diarreia	8	12	-	-	2	22,2	-	-	10	13,3	-	-
Radiodermite	39	59	1	1,5	5	55,5	-	-	44	58,6	1	1,4

Neutropenia febril ocorreu em dois pacientes, um paciente apresentou suspeita clínica de deficiência de Diidropirimidina Desidrogenase (DPD), um paciente HIV+ apresentou infarto agudo do miocárdio (IAM) durante infusão do 5-FU. Um paciente HIV-

apresentou Síndrome de Fournier antes do início da QRT e, devido à contra indicação temporária de radioterapia, foi submetido a dois ciclos iniciais de tratamento carboplatina e paclitaxel. Após cicatrização da ferida operatória conseguiu realizar o tratamento proposto com QRT. Não houve morte relacionada ao tratamento.

Todos os pacientes HIV+ incluídos neste estudo eram inicialmente candidatos ao tratamento completo com QRT. Dois pacientes não completaram 100% da quimioterapia, um por IAM e um por linfopenia grau 4. Estes dois pacientes não apresentaram progressão de doença aos 6 meses após término da QRT. Dessa forma, os outros sete pacientes HIV+ conseguiram realizar o tratamento completo, incluindo os três pacientes com progressão de doença aos 6 meses após o término da QRT.

5.5 Avaliação de biomarcadores

Foi realizada pesquisa de biomarcadores em 68 amostras teciduais de pacientes com avaliação de resposta aos 6 meses após QRT. Também foi realizado NGS em biopsia tumoral de dois pacientes que foram excluídos das análises de correlação com resposta ao tratamento, por apresentarem doença metastática na revisão dos exames de imagem (Figura 5).

Figura 5 - Pesquisa de biomarcadores em 68 amostras teciduais de carcinoma epidermóide de canal anal

5.5.1 HPV

Utilizando PCR ou HIS a pesquisa de HPV foi realizada em 68 amostras, sendo indeterminada em um caso por falha dos dois testes. Nas 67 amostras onde foi possível realizar a pesquisa de HPV foi constatada a presença do vírus em 47 (70,1%). HPV de alto risco foi encontrado em 45 (66%), um paciente apresentou HPV de alto e baixo risco e outro apenas HPV de baixo risco (Figura 7).

A genotipagem por PCR pôde ser realizada em 39 amostras; no restante, houve falha do teste por ausência de sinal no gene controle da reação, provavelmente devido a aspectos pré analíticos das amostras. Essas amostras, que não puderam ser avaliadas pelo teste *PapilloCheck®*, foram submetidas à pesquisa de HPV por hibridização *in situ* (Figura 6).

Fonte: Figura 6 : Adaptado de Surg Oncol Clin N Am. 2017 Jan;26(1):57-71. Hoff et al., Pathology of Anal Cancer. 2017. Usado com a permissão de Elsevier⁽⁸⁾

Figura 6 - Pesquisa de HPV na hibridização *in situ*. **A-** Positividade na pesquisa HPV de alto risco. **B-** Marcação difusa, com sinal uniforme no núcleo das células neoplásicas

Nas 39 amostras avaliadas por PCR 25 apresentaram HPV. O HPV 16 foi o mais prevalente, presente em 20 pacientes. O HPV 35 foi identificado em três amostras, HPV 45 em uma e HPV 6 em uma. A pesquisa de HPV foi negativa em 14 amostras.

Nos 28 pacientes avaliados por HIS, 21 apresentaram HPV positivo de alto risco e um co-infecção por HPV de alto e baixo risco, seis amostras apresentaram teste negativo para alto e baixo risco.

Figura 7 - Pesquisa de HPV. O HPV foi encontrado em 70,1% dos casos, sendo o mais frequente o HPV 16

5.5.2 Sequenciamento do DNA tumoral por NGS

Após recrutamento inicial dos 78 pacientes, foi obtido material parafinado contendo biopsia tumoral de 70 (68 puderam ser avaliados para resposta pós QRT) (Figura 5).

Após avaliação inicial, 31 pacientes apresentaram concentração e qualidade de DNA satisfatória para prosseguir a realização do sequenciamento. Após realização do sequenciamento genético 27 amostras apresentaram resultados analisáveis. Em duas delas foi possível realizar parcialmente a leitura dos resultados, devido à cobertura média inferior a 1.000x em alguns dos genes avaliados (Anexos 7 e 8) .

Considerando os 75 pacientes com avaliação de resposta 6 meses após o tratamento, 25 pacientes tiveram o DNA tumoral sequenciado. As mutações selecionadas para associação com resposta ao tratamento, conforme descrito em materiais e métodos, estão listadas na Tabela 9. Foi encontrada pelo menos uma mutação em 17 pacientes. Os genes mais frequentemente mutados foram *PIK3CA* e *MET*, em seis pacientes. Em quatro amostras foram encontradas mais de uma mutação. Três pacientes apresentaram mutação de *TP53*.

Não foi observada diferença na taxa de resposta completa aos 6 meses após o término da QRT, de acordo com a presença de mutações no gene *MET* (50% vs. 47,3%, $p=1$; teste exato de Fisher) ou do gene

PIK3CA (33,3% vs. 52,6%, $p=0.6$; teste exato de Fisher). A presença do polimorfismo *TP53* codon 72, encontrado em 18 pacientes (72%) também não influenciou a resposta ao tratamento (44% vs. 57%, $p=0,6$ teste exato de Fisher).

Também não foi observada diferença na taxa de resposta completa e parcial combinada aos 6 meses após o término da QRT, de acordo com a presença de mutações no gene *MET* (50% vs. 84,2%, $p=0,12$; teste exato de Fisher) ou do gene *PIK3CA* (86,3% vs. 73,6%, $p=1$; teste exato de Fisher). A presença do polimorfismo *TP53* codon 72, também não influenciou de forma significativa a resposta ao tratamento (66% vs. 100%, $p=0,13$ teste exato de Fisher).

Quando comparados os grupos com qualquer mutação e sem mutação também não foi observada diferença estatisticamente significativa em taxa de resposta completa (58,8% vs. 25%, $p=0,2$ teste exato de Fisher), nem em resposta parcial ou completa (82,3 vs. 62,5%, $p=0,34$ teste exato de Fisher).

As outras mutações foram encontradas em frequências muito baixas que impediram análises inferenciais de associação com taxa de resposta.

Nos dois pacientes que foram excluídos da avaliação de resposta (Figura 5), um paciente apresentou mutação em *TP53* (Tabela 9).

Tabela 9 - Mutações no DNA tumoral

Gene	Exon	Sequência Referência	Variante	Modificação prevista na proteína	Tipo	Classificação	HIV	HPV	Amostra
<i>APC*</i>	15	NM_000038.5:c.3985C>T	c.3985C>T	p.His1329Tyr	<i>Missense</i>	Não Avaliada	-	+ / HPV 16	48
<i>BRAF*</i>	11	NM_004333.4:c.1379G>A	c.1379G>A	p.Gly460Glu	<i>Missense</i>	Não Avaliada	-	+	42
<i>CDH1</i>	12	NM_004360.3:c.1849G>A	c.1849G>A	p.Ala617Thr	<i>Missense</i>	Significado Incerto	-	+ / HPV16	30
<i>FBXW*</i>	10	NM_033632.3:c.1420G>A	c.1420G>A	p.Val474Ile	<i>Missense</i>	Não Avaliada	-	+ / HPV 16	38
<i>FBXW7</i>	10	NM_033632.3:c.1550G>A	c.1550G>A	p.Gly517Glu	<i>Missense</i>	Patogênica	-	+ / HPV16	05
<i>FBXW7</i>	12	NM_033632.3:c.1972C>T	c.1972C>T	p.Arg658Ter	<i>Stop Gain</i>	Patogênica	-	+ / HPV35	31
<i>KRAS*</i>	5	NM_004985.3:c.564G>A	c.564G>A	p.Met188Ile	<i>Missense</i>	Não Avaliada	-	+ / HPV16	48
<i>MET</i>	2	NM_001127500.1:c.1075C>T	c.1075C>T	p.Arg359Ter	<i>Stop Gain</i>	Significado Incerto	-	+	24
<i>MET*</i>	2	NM_001127500.1:c.818C>T	c.818C>T	p.Thr273Ile	<i>Missense</i>	Não Avaliada	+	-	32
<i>MET</i>	2	NM_001127500.1:c.457G>A	c.457G>A	p.Asp153Asn	<i>Missense</i>	Significado Incerto	+	+ / HPV16	36
<i>MET</i>	2	NM_001127500.1:c.607T>A	c.607T>A	p.Ser203Thr	<i>Missense</i>	Significado Incerto	-	+ / HPV16	48
<i>MET*</i>	21	NM_001127500.1:c.4058delC	c.4058delC	p.Arg1354GlyfsTer17	<i>Frameshift</i>	Não Avaliada	-	+ / HPV16	51
<i>MET</i>	2	NM_001127500.1:c.504G>T	c.504G>T	p.Glu168Asp	<i>Missense</i>	Não Avaliada	+	-	76
<i>NRAS*</i>	4	NM_002524.4:c.304C>T	c.304C>T	p.Arg102Ter	<i>Stop Gain</i>	Não Avaliada	-	+ / HPV16	16
<i>PDGFRA</i>	18	NM_006206.4:c.2458G>A	c.2458G>A	p.Ala820Thr	<i>Missense</i>	Patogênica	+	+ / HPV16	36
<i>PIK3CA</i>	9	NM_006218.2:c.1633G>A	c.1633G>A	p.Glu545Lys	<i>Missense</i>	Patogênica	-	+ / HPV16	01
<i>PIK3CA</i>	21	NM_006218.2:c.3140A>T	c.3140A>T	p.His1047Leu	<i>Missense</i>	Patogênica	+	+ / HPV16	36
<i>PIK3CA</i>	21	NM_006218.2:c.3140A>G	c.3140A>G	p.His1047Arg	<i>Missense</i>	Patogênica	-	+ / HPV16	39
<i>PIK3CA</i>	9	NM_006218.2:c.1645G>A	c.1645G>A	p.Asp549Asn	<i>Missense</i>	Patogênica	-	+	57
<i>PIK3CA</i>	9	NM_006218.2:c.1645G>A	c.1645G>A	p.Asp549Asn	<i>Missense</i>	Patogênica	-	+ / HPV16	31
<i>PIK3CA</i>	9	NM_006218.2:c.1636C>A	c.1636C>A	p.Gln546Lys	<i>Missense</i>	Patogênica	-	+ / HPV35	74
<i>PTEN</i>	7	NM_000314.4:c.733C>T	c.733C>T	p.Gln245Ter	<i>Stop Gain</i>	Patogênica	-	+ / HPV16	30
<i>TP53</i>	9	NM_000546.5:c.970delG	c.970delG	p.Asp324MetfsTer21	<i>Frameshift</i>	Não Avaliada	-	+ / HPV16	48
<i>TP53</i>	8	NM_000546.5:c.817C>T	c.817C>T	p.Arg273Cys	<i>Missense</i>	Provável Patogênica	+	+ / HPV06	25
<i>TP53**</i>	7	NM_000546.5:c.733G>A	c.733G>A	p.Gly245Ser	<i>Missense</i>	Patogênica	-	-	78

Tabela 9 : * Mutações novas, não previamente descritas nos bancos de dados estudados. **Mutação em paciente excluído do estudo (neste caso, não foi realizada associação com resposta tumoral)

5.5.3 Expressão de PD-L1

A expressão de PD-L1 nas células tumorais foi avaliada em 61 amostras (Figura 8) e dez (16,4%) apresentaram mais que >1% de expressão (Anexo 9). A Tabela 10 mostra a expressão de PD-L1 de acordo com o HIV e HPV.

Figura 8 - Imagens representativas da pesquisa de PD-L1 por imunoistoquímica no carcinoma de células escamosas do canal anal. Em **A** >1% das células neoplásicas com positividade na membrana e em **B** ausência de marcação nas células neoplásicas

A expressão de PD-L1 também foi avaliada no infiltrado linfocitário peritumoral. Três pacientes não apresentavam infiltrado para avaliação, 24 (39%) possuíam expressão > 1% e em 34 (55%) a expressão foi negativa. Apenas quatro pacientes apresentavam expressão positiva nas células do infiltrado peritumoral e também nas células tumorais.

Tabela 10 - Expressão de PD-L1 nos pacientes HIV+

Amostra	Estadio	HIV	HPV	PD-L1 Tumor	PD-L1 Infiltrado
18	II	positivo	negativo	não expresso	3%
23	IIIA	positivo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
25	IIIB	positivo	positivo	não avaliado	não avaliado
32	II	positivo	negativo	não expresso	7%
36	IIIB	positivo	positivo	não avaliado	não avaliado
53	II	positivo	positivo	2%	10%
65	IIIA	positivo	positivo	não expresso	não expresso
66	IIIA	positivo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
76	IIIB	positivo	negativo	não expresso	5%

5.5.4 Expressão de Ki-67

Pesquisa da expressão de Ki-67 foi realizada em 65 amostras (Figura 9). A porcentagem de expressão variou de 1% até 90% por amostra, sendo o valor mediano de 50%. Pacientes HIV+ apresentaram Ki-67 mediano de 80%, maior do que o encontrado em pacientes HIV- que foi de 50% (Anexo 10).

Figura 9 - Imagens representativas da pesquisa de Ki-67 por imunoistoquímica no carcinoma de células escamosas do canal anal. Em A e B presença de marcação em 10% das células neoplásicas e em C e D presença de marcação em 80% das células neoplásicas.

5.5.5 Associação dos biomarcadores com resposta

- **Desfecho primário do estudo: Associação dos biomarcadores com resposta completa 6 meses após o tratamento**

Análises de associação entre estadió clínico, interrupção significativa de tratamento, idade, biomarcadores (HIV, HPV, expressão de Ki-67 e PD-L1) e desfecho clínico (resposta aos 6 meses) foram avaliadas através de regressão logística univariada e multivariada.

Na avaliação univariada de associação com resposta completa (Tabela 11), os pacientes com ECII apresentaram 5,2 vezes mais chances de atingir resposta completa que o pacientes com estadió III.

Tabela 11 - Análises de regressão logística univariada para prever resposta completa aos 6 meses pós QRT

Fator	Estimativa	OR	IC (95%)	p-valor
Idade	0,001	1,001	[0,954; 1,05]	0,970
Estadiamento	1,664	5,280	[1,585; 17,594]	0,007
HIV	1,386	4,000	[0,913; 17,526]	0,066
Ki-67	-0,014	0,987	[0,967; 1,007]	0,186
HPV	0,256	1,292	[0,439; 3,8]	0,642
PD-L1	0,865	2,375	[0,456; 12,369]	0,304
Interrupção significativa no tratamento	0,341	1,406	[0,491; 4,029]	0,526

Tabela 11: Resultados das análises de regressão logística univariada para prever Resposta Completa vs. Resposta Não Completa aos 6 meses após término da QRT.

Na avaliação multivariada de associação com resposta completa, os pacientes com ECII apresentaram 4,7 vezes mais chances de atingir resposta completa que pacientes com estadio III (OR=4,70; IC95%=1,36-16,30; $p=0,015$). Houve uma tendência a menor taxa de resposta completa entre os pacientes HIV+, porém sem significância estatística (OR=2,53; IC95%=0,9-7,1; $p=0,079$) (Tabela 12).

Tabela 12- Análises de regressão logística multivariada para prever resposta completa aos 6 meses pós QRT

Fator	Estimativa	OR	IC(95%)	p-valor
Estadiamento	1,549	4,704	[1,358; 16,301]	0,015
HIV	0,927	2,527	[0,899; 7,103]	0,079
Ki-67	-0,014	0,986	[0,97; 1,003]	0,107

Tabela 12: Ao nível de significância de 5%, apenas a variável EC foi um fator preditivo para a resposta completa com significância estatística. Pacientes com estadiamento ECII têm 4,704 vezes mais chance de apresentarem resposta completa do que os pacientes com estadiamento EC III.

- **Associação dos biomarcadores com resposta parcial e resposta completa seis meses após o tratamento**

Na avaliação univariada de associação com resposta completa ou parcial nenhuma das variáveis foi preditiva (Tabela 13).

Tabela 13- Análises de regressão logística univariada para prever resposta completa ou parcial aos 6 meses pós QRT

Fator	Estimativa	OR	IC(95%)	p-valor
Idade	0,020	1,020	[0,952; 1,094]	0,574
Estadiamento	1,727	5,625	[0,671; 47,124]	0,111
HIV	1,438	4,214	[0,858; 20,708]	0,077
Ki-67	-0,013	0,987	[0,958; 1,017]	0,404
HPV	0,394	1,482	[0,318; 6,902]	0,616
PD-L1	0,022	1,022	[0,106; 9,823]	0,985
Interrupção significativa no tratamento	-0,037	0,964	[0,225; 4,126]	0,960

Tabela 13: Ao nível de significância de 5%, nenhuma das variáveis foi fator preditivos para a resposta completa ou parcial com significância estatística, na análise univariada.

Na avaliação multivariada de associação com resposta completa ou parcial os pacientes com HIV- apresentaram 5,7 vezes mais chances de atingir resposta parcial ou completa que os pacientes HIV+ (OR=5,72 IC95%=2,5-13,0; $p<0,001$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Análises de regressão logística multivariada para prever resposta completa ou parcial aos 6 meses pós QRT

Fator	Estimativa	OR	IC(95%)	p-valor
Estadiamento	1,874	6,517	[0,801; 53,005]	0,080
HIV	1,744	5,720	[2,51; 13,032]	< 0,001

Tabela 14: Ao nível de significância de 5%, apenas a variável HIV foi um fator preditivo para a resposta completa ou parcial com significância estatística. Pacientes com HIV negativo têm 5,720 vezes mais chance de apresentarem resposta completa ou parcial do que os pacientes com HIV positivo.

5.5.6 Associação dos biomarcadores com sobrevida global e sobrevida livre de progressão

As medianas de sobrevida global e sobrevida livre de progressão ainda não foram atingidas, sendo os dados ainda imaturos para correlação com os biomarcadores estudados devido ao baixo número de eventos.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nesta coorte prospectiva a idade mediana foi de 57 anos, a maioria dos pacientes apresentou estadio III ao diagnóstico 65% (n=49) e 12% (n=9) sorologia positiva para HIV+. Aos 6 meses após término da QRT 62,7% (n=47) apresentaram resposta completa, 24% (n=18) resposta parcial e 13,3% (n=10) progressão de doença. O HPV foi encontrado em 70,1%, sendo o HPV 16 o mais frequente. A expressão de PD-L1 foi encontrada em 16,4% e o Ki-67 mediano foi de 50%. Foi possível a realização de sequenciamento do DNA tumoral em 25 pacientes avaliáveis para resposta, sendo as mutações mais frequentes nos genes *PIK3CA* (n=6) e *MET* (n=6). Dentre os biomarcadores estudados, apenas o HIV+ foi associado com resposta completa e/ou parcial aos 6 meses pós QRT.

O perfil molecular do câncer de canal anal, devido à sua raridade, é pouco estudado. Em estudo retrospectivo de Smaglo ⁽⁶²⁾, que incluiu 199 pacientes com doença localizada e doença metastática, foi realizada avaliação molecular de fragmentos de tumor (primário ou de metástases) e os genes mais frequentemente mutados foram *PIK3CA* em 32,6%, *TP53* em 14,8%, *FBXW7* em 14%. Pelo menos uma mutação foi descrita em 60% dos casos e em 12 amostras foram observadas mais de uma

mutação. Em nosso estudo pelo menos uma mutação foi descrita em 17 casos (68%) e em quatro amostras foram observadas mais de uma mutação.

A via da *PIK3CA* modula apoptose e sua ativação também interfere em proliferação celular e estabilidade genética. Estudos sugerem que a interação entre a via *PI3K/AKT/mTOR* e E5, E6 e E7 podem estar envolvidas no processo de desenvolvimento dos tumores HPV relacionados. Em tumores de canal anal, o gene *PIK3CA* é o mais frequentemente alterado, em até 40% dos casos (Tabela 15).⁽⁴²⁾ Em nossa amostra, 24% dos pacientes com avaliação de resposta apresentaram mutações deletérias em *PIK3CA*.

Gardini⁽⁶³⁾ tentou relacionar, em estudo retrospectivo com 50 pacientes, a presença de mutações na via *PIK3CA* com prognóstico dos pacientes. Foram incluídos pacientes com doença localizada e metastática. Não houve diferença em SLP e SG quando comparados pacientes mutados vs. não mutados. Em nosso estudo, não houve associação mutações no gene *PIK3CA* e resposta completa (33,3% vs. 52,6%, $p=0,6$) ou quando considerada resposta completa e/ou parcial (86,3% vs. 73,6%, $p=1$). Devido ao tempo de seguimento dos pacientes do nosso estudo ainda não pudemos avaliar o papel prognóstico dessa mutação.

Tabela 15 - Mutações de *PIK3CA* no câncer de canal anal

n	Exon		Resultado (n mutado)	População	Tipo de estudo	Autor
50	9	E545K	5	DL e DM	Retrospectivo	Gardini ⁽⁶³⁾ , 2014
		E542K	2			
		Q546E	1			
	20	H1047L	2			
		H1047R	1			
		<i>Total</i>	<i>11/50</i>			
127		E545K	1	-	Retrospectivo	Patel ⁽⁶⁴⁾ , 2004
		H1047R	3			
		H1047L	1			
		<i>Total</i>	<i>5/127</i>			
79	9	E542K	1	-	Retrospectivo	Martin ⁽⁶⁵⁾ , 2014
		E545K	7			
		Q546K	1			
	20	H1047K	2			
		H1048Y	1			
		<i>Total</i>	<i>12/79</i>			
86	NGS	<i>Total</i>	<i>28/86</i>	DL e DM	Retrospectivo	Smaglo ⁽⁶²⁾ , 2015
148	9,20	<i>Total</i>	<i>30/148</i>	DL e DM	Retrospectivo	Cacheux ⁽⁴³⁾ , 2016
27	9	E545K	1	DL	Prospectivo	Moniz, 2017
		Q546K	1			
		D549N	2			
	20	H1047R	1			
		H1047L	1			
		<i>Total</i>	<i>6/27</i>			

A presença da mutação *PIK3CA* no câncer de canal anal pode embasar estudos de terapia alvo. Por exemplo, em estudo de fase I com Taselesibe, um inibidor de PIK3, mostrou atividade antitumoral em pacientes com tumores portadores de mutação *PIK3CA* no domínio de

tirosina quinase H1047 ⁽⁶⁶⁾. Nesse estudo, seis pacientes apresentaram mutação em *PIK3CA*, sendo dois em H1047, demonstrando racional terapêutico dos inibidores de PI3K no câncer de canal anal.

Os transcritos do protooncogene *MET* operam como um receptor de tirosina quinase transmembrana para o HGF (*hepatocyte growth factor*). O HGF é capaz de estimular proliferação, motilidade e invasividade celular. A via de *MET* interage com a sinalização da via PIK3/AKT e mutações no gene *MET* podem conduzir as células para um fenótipo metastático. ⁽⁶⁷⁾

O aumento da expressão e amplificação do *MET* pode estar associado com resistência ao tratamento oncológico ⁽⁶⁸⁾ e, em pacientes com câncer gástrico, foi relacionado a pior prognóstico. ⁽⁶⁹⁾ Em pacientes com câncer de canal anal, apenas Smaglo ⁽⁶²⁾ descreveu uma amostra com mutação no gene *MET*.

No presente estudo, as mutações no gene *MET* foram frequentes, encontradas em 24% dos pacientes, porém não foi observada influência do gene *MET* em resposta completa (50% vs. 47,3%, $p=1$) ou em resposta parcial e completa (50% vs. 84,2%, $p=0,12$).

Pelo menos cinco moléculas de terapia alvo têm sido estudadas em pacientes com mutações de *MET*, incluindo os inibidores de tirosina quinase: crizotinibe, cabozantinibe, capmatinibe, tepotinibe e o

glesatinibe.⁽⁷⁰⁾ Algumas mutações em *MET*, como as *skipping* no exon 14, têm mostrado implicações clínicas e terapêuticas nesse cenário.⁽⁷¹⁾ Dessa forma, consideramos que drogas inibidoras de *MET* devem ser estudadas em pacientes com câncer de canal anal e mutação em *MET*.

Mouw⁽⁷²⁾ demonstrou mutação de *TP53* em quatro amostras de seis pacientes com recorrências de doença no grupo HPV negativo. No grupo HPV+ apenas um paciente entre os 22 recidivados apresentou mutação em *TP53*.⁽⁷²⁾ Cacheux⁽⁴³⁾ avaliou 148 pacientes e observou mutação de *TP53* em 4,7%, todas em amostras de tumor recorrente. Em nosso estudo foi encontrada mutação de *TP53* em três pacientes, apenas um com HPV- (Tabela 9).

A influência do polimorfismo do gene *TP53* (c.215C>G/p.Pro72Arg) na resposta ao tratamento do câncer de canal anal é desconhecida. Esse polimorfismo proporciona uma ligação mais estável entre a oncoproteína E6, a ubiquitina-ligase E6AP e a proteína p53, levando a degradação de p53 de forma mais intensa do que a forma Pro.⁽⁷³⁻⁷⁵⁾ Estudos sugerem que a presença desse polimorfismo em homozigose, em células germinativas, está associada a sete vezes mais chance de desenvolvimento de tumores HPV relacionados,⁽⁷⁶⁾ quando comparado aos indivíduos heterozigotos. Ao nosso conhecimento, esse foi o primeiro estudo a avaliar se esse polimorfismo, quando presente em

células tumorais, poderia influenciar a resposta ao tratamento. O polimorfismo foi encontrado 72% das amostras. Embora a associação com resposta parcial e completa tenha sido negativa pelo teste exato de Fisher (66% vs. 100%, $p=0,13$), chama a atenção a taxa de resposta completa e/ou parcial de 100% aos 6 meses pós tratamento entre os pacientes não portadores dessa alteração genética. São necessários estudos com maior número de pacientes e análises multivariadas para melhor definição da influência desse biomarcador na resposta ao tratamento com QRT. Nossos achados também levantam a hipótese de que pacientes portadores desse polimorfismo podem ter maior benefício do uso da vacina contra o HPV, como forma de prevenção de neoplasias HPV induzidas.

Outros estudos investigaram de forma pontual a presença de mutações nos gene *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* (Tabelas 16, 17 e 18) e demonstraram baixa prevalência; o que foi concordante com nosso resultado.

Tabela 16 - Mutação no gene *KRAS*

n		Mutações	Resultado (n mutado)	População	Tipo de estudo	Autor
30	Exon 2	-	0	-	Retrospectivo	Van Damme ⁽⁷⁷⁾ , 2010
89	Exon 2	-	0	-	Retrospectivo	Paliga ⁽⁷⁸⁾ , 2012
19	Códons 12,13,15	-	0	-	Retrospectivo	Prigge ⁽⁷⁹⁾ , 2014
82	Exons 2-3	G12D G12V	3 1	-	Retrospectivo	Martin ⁽⁶⁵⁾ , 2014
		<i>Total</i>	4/82			
50	Codon12, 13,61 e 146	-	0	DL e DM	Retrospectivo	Gardini ⁽⁶³⁾ , 2014
190	Codon 12 e 13	G12D G12C G12V <i>Total</i>	1 1 1 3/190	DL e DM	Retrospectivo	Serup-Hansen ⁽⁸⁰⁾ ,2014
99	NGS	<i>Total</i>	2/99	DL e DM	Retrospectivo	Smaglo ⁽⁶²⁾ ,2015
148	Exons 2-4	<i>Total</i>	3/198	DL e DM	Retrospectivo	Cacheux ⁽⁴³⁾ ,2016
27	Exons 1-4	M188I	1	DL	Prospectivo	Moniz, 2017
		<i>Total</i>	01/27			

Tabela 16: Mutação no Gene *KRAS* em Câncer de Canal Anal. DL: doença localizada, DM: Doença metastática.

Tabela 17 - Mutação no gene *BRAF*

n	Mutações	Resultado (n mutado)	População	Tipo de estudo	Autor	
23	?	-	0	DL e DM	Retrospectivo	Gilbert ⁽⁸¹⁾ , 2013
50	Exon 11,15	-	0	DL e DM	Retrospectivo	Gardini ⁽⁶³⁾ , 2014
80	Exon 15	-	0	-	Retrospectivo	Martin ⁽⁶⁵⁾ , 2014
10	Códon 600	-	0	-	Retrospectivo	Prigge ⁽⁷⁹⁾ , 2014
184	Codon 600	8 V600E 1 V600D <i>Total</i>	9 9/184	DL e DM	Retrospectivo	Serup-Hansen ⁽⁸⁰⁾ , 2014
68	NGS	-	0	DL e DM	Retrospectivo	Smaglo ⁽⁶²⁾ , 2015
148	Exon 15	-	0	DL e DM	Retrospectivo	Cacheux ⁽⁴³⁾ , 2016
27	Exon 11,15	G460E	1	DL	Prospectivo	Moniz, 2017
		<i>Total</i>	1/27			

Tabela 17: Mutação no Gene *BRAF* em Câncer de Canal Anal. DL: doença localizada, DM: Doença metastática.

Tabela 18 - Mutação no gene *EGFR*

n	Exon	Mutações	Resultado (n mutado)	população		Autor
30	18-21	-	0	-	Retrospectivo	Vam Damme ⁽⁷⁷⁾ , 2010
89	19,21	Exon 21 <i>Total</i>	3 <i>3/89</i>		Retrospectivo	Paliga ⁽⁷⁸⁾ , 2012
68	NGS	-	0	DL e DM	Retrospectivo	Smaglo ⁽⁶²⁾ , 2014
27	18-21	-	0		Prospectivo	Moniz, 2017

Tabela 18: Mutação no Gene *EGFR* em Câncer de Canal Anal. DL: doença localizada, DM: doença metastática.

A presença do HPV e seus tipos no tecido tumoral de pacientes com câncer de canal anal varia de acordo com a população estudada. Parece haver influência da genética do hospedeiro e de características intrínsecas do vírus no processo de infecção e *clearance* viral.⁽⁸²⁾

Em revisão sistemática publicada por Hoots⁽⁸³⁾ contendo 992 casos de câncer de canal anal, submetidos à pesquisa de HPV por captura híbrida ou PCR, a infecção pelo vírus foi encontrada em 71% dos casos (78% quando considerado somente a histologia escamosa). O tipo prevalente foi o HPV 16 presente em 85,1% dos casos, HPV18 em 7,2% e HPV 6 em 7,1%. Nas 67 amostras avaliadas neste estudo, 70,1% foram positivas para HPV, de forma concordante ao descrito pela literatura. Nos 25 casos com avaliação do tipo viral, 20 apresentaram HPV 16 e nenhum paciente apresentou infecção por HPV 18. A prevalência de HPV e seus tipos no câncer de canal anal em população brasileira é pouco estudada. Em amostras de *swab* anal de 863 pacientes brasileiros HIV positivo foi encontrada presença de HPV 16 em 19,7% dos pacientes e HPV 18, em 4,6%.⁽⁸⁴⁾

O impacto da infecção por HPV, no desfecho após tratamento em câncer de canal anal, é controverso. Em estudo retrospectivo com 47 pacientes, Yhim verificou que a SLP em pacientes tratados QRT em 4 anos foi maior entre pacientes com tumor HPV 16 positivo vs. HPV 16

negativo (63% vs. 16%, $p < 0,001$).⁽⁸⁵⁾ Revenda⁽⁸⁶⁾ avaliou a presença de HPV no tecido tumoral de 50 pacientes, sendo 84% HPV positivo. O grupo HPV+ apresentou melhor sobrevida livre de doença em 5 anos em análise multivariada (HR=0,10; IC95%=0,02-0,50; $p < 0,01$), mas não foi observada diferença em sobrevida global (HR=0,15 IC95%=0,01-1,52; $p = 0,12$). Urgoiti⁽⁸⁷⁾ pesquisou HPV em 42 pacientes e não encontrou associação do HPV 16 com sobrevida livre de progressão e sobrevida global. Devido nosso tempo de seguimento, ainda não podemos avaliar se houve relação entre positividade do HPV e sobrevida livre de doença ou em sobrevida global.

Em nosso estudo não foi observada influência do HPV em resposta completa aos 6 meses após término de tratamento com QRT (OR=1,2; IC95%=0,43-3,8; $p = 0,6$). Também não houve influência do HPV, quando avaliada resposta completa ou parcial ao tratamento (OR=1,48, IC95%=0,3-6,9; $p = 0,6$).

A exposição à infecção genital pelo HPV é bastante frequente, mas a maioria das pessoas é capaz de eliminar o vírus de forma espontânea.⁽⁸⁸⁾ Essa imunidade, mediada por células T, é estimulada por proteínas virais imunogênicas.^{(89) (90)} Alguns tumores podem produzir o *programmed death-ligand 1* (PD-L1), que é capaz de reduzir a ativação de células T. Através de sua ligação com o receptor de regulação

negativa PD-1 (*programmed cell death 1*), que fica na superfície da célula T, o PD-L1 facilita a evasão tumoral do sistema imune ^(34, 89, 90). Aproximadamente 50% dos tumores de canal anal expressam PD-L1, segundo estudo de Yanik, ⁽⁴⁷⁾ que incluiu 40 casos, com 31% das amostras provenientes de sítios de metástase. Um estudo retrospectivo de coorte tentou avaliar a influência da expressão de PD-L1, em 41 pacientes com câncer de canal anal. ⁽⁹¹⁾ Pacientes que possuíam tumor que expressava PD-L1 tiveram mais recidiva e mortalidade. Nossa taxa de expressão de PD-L1 foi de 16,4%, menor do que o reportado na literatura. Nosso estudo padronizou o uso de amostras coletadas do tumor primário, antes do início do tratamento, o que pode ter influenciado na expressão de PD-L1. Além disso, em análise multivariada, a expressão de PD-L1 não influenciou a taxa de resposta completa em nossos pacientes (OR=2,37 IC95%=0,45-12,3; p=0,3). Também não houve influência na taxa de resposta completa e/ou parcial (OR=1,02; IC95%=0,1-9,8; p=0,9). No cenário metastático o nivolumabe, um anticorpo monoclonal anti-PD-1, se mostrou efetivo no tratamento do câncer de canal metastático, com taxa de resposta objetiva de 24%. ⁽³⁴⁾

Estudos retrospectivos tentaram estabelecer o papel do Ki-67 no câncer de canal anal, com resultados conflitantes. Allal ⁽⁹²⁾ avaliou 55

pacientes com tumor de canal anal e encontrou Ki-67 mediano de 53% (18%-96%). Para correlação com resposta, ele separou os pacientes em grupo de Ki-67 alto (>53%) e grupo de Ki-67 baixo (<53%). A sobrevida livre de doença (73% vs. 66% $p=0,5$) e sobrevida global (64% vs. 69% $p=0,07$) foram similares nos dois grupos. Indinnimeo⁽⁹³⁾ não observou correlação entre o valor de Ki-67 e recidiva de doença.⁽⁹³⁾ Ajani⁽⁹⁴⁾ avaliou 30 pacientes e em análise multivariada níveis elevados de Ki-67 foram associados com melhor resposta e sobrevida livre de doença, no estudo de Grabenbauer⁽⁹⁵⁾ Ki-67 elevado foi associado à melhor sobrevida livre de colostomia (90 vs. 50%; $p=0,04$). Em nosso estudo observamos que o Ki-67 não apresentou associação com resposta completa aos 6 meses após o término de tratamento. Também não houve influência quando considerada resposta parcial e completa. A mediana de Ki-67 entre os pacientes HIV+ foi de 80% e, entre os pacientes HIV-, de 50%. Os estudos prévios não realizaram avaliação de HIV de forma sistemática e isso pode ter sido um viés de confusão oculto.

Apesar do tumor de canal anal ser até 80 vezes mais prevalente em pacientes HIV+, esses pacientes foram excluídos dos principais estudos prospectivos e randomizados que incluíram pacientes com tumor de canal anal localizado.⁽²⁸⁾ Estudos retrospectivos, com pequeno número de pacientes, apresentam resultados controversos quanto ao desfecho

após tratamento com QRT em pacientes portadores de HIV. Estudo publicado em 2015 por Grew ⁽⁴⁵⁾ mostrou maior taxa de hospitalização durante o tratamento em pacientes HIV+ (33% vs. 15%; $p=0,024$), mas sem diferença em sobrevida global entre HIV+ e HIV-, em análise multivariada. Em estudo publicado por Meyer ⁽⁹⁶⁾, que incluiu pacientes com estadios clínicos I a IV, os pacientes HIV+ apresentaram maior taxa de recorrência que pacientes HIV- (50% vs. 23 %, $p=0,09$). Estudo populacional dinamarquês mostrou taxa de mortalidade três vezes maior em pacientes HIV+ portadores de câncer de canal anal quando comparado ao grupo controle HIV-.⁽¹⁷⁾ Fraunholz ⁽⁴⁶⁾ estudou 36 pacientes HIV+ e verificou taxa de resposta completa de 86% e taxa de controle local em 5 anos de 72%; dados numericamente compatíveis com dados históricos de pacientes HIV-.

A interpretação dos dados em pacientes com câncer de canal anal e HIV é bastante limitada, pois se tratam de séries retrospectivas com pequeno número de pacientes; com diferentes estadios e com tratamento/avaliação de resposta não controlados. Nos pacientes HIV+, as diretrizes de tratamento autorizam adaptações no esquema de quimioterapia,⁽³²⁾ levando em conta a imunossupressão e a presença de infecções oportunistas. Portanto, uma parcela dos pacientes HIV+ recebem radioterapia isolada; outra quimioterapia, apenas

fluoropirimidinas (5-FU ou capecitabina) e outra, esquema completo de QRT. Esse fato dificulta, nos estudos retrospectivos, a avaliação da real influência do HIV+ na resposta ao tratamento.

No presente estudo, 12% da população apresentou sorologia positiva para HIV+ e estes receberam o mesmo tratamento proposto aos pacientes HIV-. Na avaliação de resposta seis meses após o tratamento, 66,7% dos pacientes HIV- apresentaram resposta completa em contraste com 33,3% dos pacientes HIV+. Quando considerada resposta parcial e/ou completa, os pacientes HIV- responderam melhor ao tratamento quando comparados ao grupo HIV+ (89,4% vs. 66,6%).

Em análise multivariada, houve uma tendência para influência do HIV para resposta completa aos seis meses após o tratamento (OR, 2,52; IC95%=0,89-7,1; $p=0,079$), porém sem significância estatística. Quando avaliada a influência do HIV, considerando resposta completa e parcial, os pacientes HIV- apresentaram 5,7 vezes mais chance de apresentar resposta ao tratamento do que pacientes HIV+, com significância estatística na análise multivariada (OR=5,72; IC95%=2,5-13,0; $p<0,001$). Nossos achados sugerem que os pacientes HIV+ apresentam menor sensibilidade ao tratamento com QRT e maior chance de falha ao tratamento multimodal. As diretrizes atuais de seguimento não contemplam estratégias diferenciadas nos pacientes HIV+⁽³²⁾, o que deve

ser revisto. Estudos colaborativos multicêntricos devem ser realizados, a fim de verificar se a incorporação de exames de imagem com intervalo mais curto, no seguimento dos pacientes HIV+, teria impacto em sobrevida, tendo em vista que, nos casos de recidiva local exclusiva, o paciente ainda pode ser submetido à cirurgia de resgate com intuito curativo. A presença do vírus HIV tem ainda potencial para influenciar na sobrevida livre de progressão e sobrevida global desses pacientes, porém nossos dados ainda estão imaturos para essa análise.

Limitações deste estudo devem ser mencionadas. Este é um estudo unicêntrico e, devido à dificuldade de conservação do DNA tumoral em material parafinado, um número reduzido de amostras puderam ser submetidas a sequenciamento genético. São necessários novos estudos, multicêntricos e prospectivos com padronização na coleta da amostra tumoral, para melhor descrição do perfil e do papel prognóstico das mutações presentes no CEC de canal anal. Devido ao tempo de seguimento, nossos dados ainda estão imaturos para correlação com sobrevida livre de progressão e sobrevida global. Por outro lado, este foi um estudo prospectivo com padronização de tratamento e seguimento dos pacientes, sendo todos os exames de imagem revisados por um único radiologista especialista em neoplasias de reto e ânus.

7 PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

O HPV e o HIV são os principais fatores de risco para o câncer de canal anal. O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) estima que o HPV é responsável por 31.500 casos de câncer por ano nos Estados Unidos, incluindo colo uterino, vagina, vulva, pênis, anus, reto e orofaringe. Na maioria dos casos (79%), os tumores são ocasionados pelo HPV 16 e 18. ⁽⁹⁷⁾ No Brasil, foram notificados 38.776 casos de AIDS em 2011, com incidência crescente na população de 17 a 20 anos. ⁽⁹⁸⁾ Portanto, ainda que não haja dados fidedignos sobre a incidência de câncer de canal anal entre pacientes HIV positivos no Brasil, a estimativa é de que o número de casos deva estar em ascensão.

Além do estudo da biologia tumoral e do desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para o câncer de canal anal, é fundamental garantir informação e acesso da população aos métodos básicos de prevenção do HIV e HPV, como o uso de preservativo e da vacina para HPV. ⁽⁹⁹⁾

Atualmente o Ministério da Saúde recomenda no Brasil a vacinação para prevenção contra os 4 tipos do HPV mais prevalentes (6, 11, 16, 18). A vacina na rede básica de saúde é oferecida para meninas dos 9 aos 13 anos e meninos entre 12 e 13 anos. Nos portadores de HIV,

a vacina é oferecida dos 9 aos 26 anos. ⁽¹⁰⁰⁾ Apesar da distribuição gratuita, a aderência ao programa de vacinação ainda permanece baixa; em março de 2016 apenas 43% das meninas de 9-11 anos havia recebido a segunda dose da vacina. ⁽¹⁰¹⁾ Campanhas de conscientização da população são cruciais para promover aderência máxima à vacina anti-HPV.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- Pacientes com estadio II apresentaram 4,7 vezes mais chances de atingir resposta completa que os pacientes com estadio III aos 6 meses pós QRT.
- Os pacientes HIV- apresentaram 5,7 vezes mais chance de apresentar resposta completa e/ou parcial que pacientes HIV+ aos 6 meses pós QRT.
- Idade, HPV+, HIV, interrupção de tratamento e expressão de Ki-67 e PD-L1 não foram preditores de resposta completa aos 6 meses pós QRT.
- Idade, HPV+, estadio, Ki-67, interrupção de tratamento e expressão de Ki-67 e PD-L1 não foram preditores de resposta completa e/ou parcial aos 6 meses pós QRT.
- O estadiamento clínico III e a presença do vírus HIV foram preditores de resposta ao tratamento com QRT no carcinoma epidermóide de canal anal localizado. Dessa forma, deve ser investigado qual a melhor forma de acompanhamento para esses pacientes, visto que apresentam maior chance de falha ao tratamento multimodal.

- As mutações em *MET*, *PIK3CA* e o polimorfismo de *TP53* (c.215C>G/p.Pro72Arg) não influenciaram a resposta completa aos 6 meses pós QRT.
- Neste estudo, as mutações em *MET*, *PIK3CA* e o polimorfismo de *TP53* (c.215C>G/p.Pro72Arg) não influenciaram a resposta completa e/ou parcial, aos 6 meses pós QRT.
- A descrição do perfil molecular do carcinoma epidermóide de canal anal pode auxiliar o desenvolvimento de novos estudos e a influência do polimorfismo do códon 72, na história natural da doença, deve ser investigada. A presença de mutações em *PIK3CA* e *MET* sinaliza o potencial terapêutico das drogas de alvo molecular dirigidas a essas vias de sinalização.

9 ANEXOS

9 ANEXOS

Anexo 1 - Estadiamento TNM - AJCC VII edição

Tumor Primário (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor de 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm, mas não mais de 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm na sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho que invade órgão(s) adjacente(s)
Linfonodos Regionais (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Nenhuma metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) perirretal(is)
N2	Metástase em linfonodo(s) ilíaco unilateral interno e/ou inguinal
N3	Metástase em linfonodos perirretal e inguinal e/ou ilíaco interno bilateral e/ou linfonodos inguinais
Metástase à Distância (M)	
Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Nenhuma metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: Tabela reproduzida com permissão, American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois, AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed.

Anexo 2 - Agrupamento por Estadio - AJCC VII Edição

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Estadio IIIB	T4	N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Tabela reproduzida com permissão, American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois, AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed.

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Disponível em 03/10/2011
Por: *[assinatura]*
Pesquisa Clínica - ICESP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../..... Nº: APTO:
- ENDEREÇO: CIDADE:
- BAIRRO: TELEFONE: DDD (.....)
- CEP:
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../..... Nº: APTO:
- ENDEREÇO: CIDADE:
- BAIRRO: TELEFONE: DDD (.....)
- CEP:

1. DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

"Título: Perfil de Expressão de Biomarcadores em Pacientes com Carcinoma de Canal Anal e Correlação com Falha ao Tratamento com Químio-radioterapia."

PESQUISADOR: Rachel Simões Pimenta Riechelmann
CARGO/FUNÇÃO: Médica
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 98131
UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 1 ano e 6 meses

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO

O Instituto do Câncer do Estado de São Paulo exige e aprova a prática da correta informação dos pacientes que participam de estudos clínicos. As informações a seguir são fornecidas para que você decida se deseja participar ou não deste estudo clínico. Você pode se recusar a assinar este documento e não participar deste estudo. Caso você aceite participar deste estudo, estará livre para se retirar do mesmo em qualquer momento. Se optar por não participar sua relação com a instituição onde você está sendo tratado não sofrerá qualquer interferência.

Seu médico lhe explicou que você tem câncer de canal anal. As células tumorais (incluindo as células do tumor de canal anal) são portadoras de alterações genéticas. Estas alterações genéticas podem tornar a célula tumoral mais sensível ou mais resistente ao tratamento com radioterapia e ao tratamento com determinados tipos de quimioterapia. Atualmente ainda não são conhecidas características do tumor de canal anal que indiquem ao médico quais pacientes terão maior chance de sucesso ou de falha no tratamento com quimioterapia e radioterapia. Você está sendo convidado (a) participar de uma pesquisa que estudará as características do tumor de canal anal e sua possível relação com resposta ao tratamento com quimioterapia e radioterapia.

OBJETIVOS DO ESTUDO

O principal objetivo deste estudo é avaliar como as características das células tumorais influenciam o sucesso do tratamento do câncer de canal anal. A sucesso do tratamento é o desaparecimento completo do tumor (cura).

Este protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de seu Hospital, que é um comitê formado de acordo com a legislação nacional, para garantir a proteção dos indivíduos.

O QUE ACONTECERÁ COM VOCÊ E QUAIS OS PROCEDIMENTOS SERÃO REALIZADOS NO ESTUDO

Se você aceitar participar do estudo, você irá:

- Assinar este termo de consentimento
- Permitir o uso do bloco de parafina referente à sua biópsia para pesquisa de alterações genéticas no tumor.
- Permitir o acesso às informações contidas em seu prontuário médico.
- 50 pacientes serão analisados neste estudo.

QUAIS OS RISCOS E DESCONFORTOS

Não existe risco de dor ou desconforto.

Este estudo será feito utilizando o bloco de parafina referente à biópsia de seu tumor.

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Disponível em
07/19/2011
Por: [assinatura]
Pesquisa Clínica - ICESP

BENEFÍCIOS ESPERADOS

No caso do câncer de canal anal ainda não é possível prever o sucesso ao tratamento. Com a sua participação neste estudo existe a possibilidade de encontrarmos algum marcador, que quando presente na biópsia do tumor, indique antecipadamente ao médico a chance de sucesso ou de falha do tratamento com quimioterapia e radioterapia. Os resultados deste estudo poderão ajudar o desenvolvimento de novos tratamentos para aqueles pacientes que não obtiveram sucesso com o tratamento. **Seu tratamento não sofrerá interferência se você participar deste estudo, contudo, através das informações obtidas através do estudo do seu tumor, você poderá ajudar outros pacientes com câncer de canal anal.**

SUA PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você poderá sair da pesquisa a qualquer momento sem afetar o seu acompanhamento no hospital.

CIRCUNSTÂNCIAS E/OU RAZÕES PREVISÍVEIS PELAS QUAIS A PARTICIPAÇÃO DO PACIENTE NO ESTUDO POSSA SER ENCERRADA

Seu médico poderá encerrar a sua participação no estudo caso o bloco de parafina de sua biópsia não esteja em condições de ser analisado, caso isso aconteça você será comunicado.

QUAIS OS SEUS DEVERES

Entregar o bloco de parafina ou permitir que o seu médico, responsável pelo estudo, retire o material que está armazenado no ICESP para que seja feita a análise de seu tumor. Caso sua biópsia esteja armazenada em outro local fora do ICESP você deverá trazer o material e entregar ao médico responsável pelo estudo. **Não haverá custo ou remuneração financeira pela sua participação no estudo.**

GARANTIA DE ACESSO AO SERVIÇO

Durante a participação no estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann e tendo como executante a Dra. Camila Motta Venchiarutti Moniz que pode ser encontrada no endereço **Avenida Dr. Arnaldo, 251**. Telefone(s) 3893-4241 ou 3893-4531. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Endereço: Instituto Oscar Freire da FMUSP – Av. Dr. Arnaldo, 455 – 1.º andar, CEP: 01246-903 – tel: 3061-8424 – E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Perfil de Expressão de Biomarcadores em Pacientes com Carcinoma de Canal Anal e Correlação com Falha ao Tratamento com Químio-radioterapia." Eu discuti com o Dr. () sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

ASSINATURAS

_____ Nome do participante da pesquisa (LETRA DE FORMA)	_____ Data ¹	_____ Assinatura do participante da pesquisa
_____ Nome da pessoa que conduziu a discussão sobre o termo de consentimento (LETRA DE FORMA)	_____ Data ¹	_____ Assinatura da pessoa que conduziu a discussão sobre o termo de consentimento
_____ Nome do responsável legal ou testemunha, se aplicável (LETRA DE FORMA)	_____ Data ¹	_____ Assinatura do responsável legal ou testemunha, se aplicável

1. Cada pessoa que assinar o termo de consentimento deve pessoalmente escrever a data em que assinou o documento.

Anexo 4 - Aprovação pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

<p>INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO Octávio Frias de Oliveira Secretaria de Estado da Saúde Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo</p>	<p>FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA</p>
---	---

São Paulo, 29 de julho de 2011

Registro: NP 166/2011

Ref. Solicitação de execução de estudo: "Perfil de Expressão de Biomarcadores no Carcinoma de canal Anal e Correlação com Falha ao Tratamento com Químio-Radioterapia"

Pesquisador responsável: Dra. Camila M. V. Moniz

Prezado Pesquisador

CONSIDERAÇÕES

Trata-se estudo exploratório de coorte prospectivo que avaliará a presença de marcadores moleculares no carcinoma de canal anal em pacientes tratados com quimioterapia concomitante a radioterapia oferecido no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. O objetivo primário deste estudo é identificar biomarcadores que se correlacionem com desfechos de eficácia (resposta ao tratamento) em pacientes com carcinoma de células escamosas (CEC) do canal anal após tratamento com quimio-radioterapia.

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

Antes do início dos procedimentos relacionados ao estudo:

- Iniciar as atividades do estudo somente após aprovação/ciência do Comitê de Ética em Pesquisa para execução no ICESP segundo a Res. 196/96;
- Encaminhar, mensalmente, ao NGP, a lista nominal de pacientes no estudo. (Todos: ativos, inseridos ou excluídos no período).
- Fornecer cópia da Carta de Aprovação e Relatório Semestral com ciência do CEP ao NGP- ICESP;
- Enviar Publicação dos resultados do estudo;

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff
Diretor Clínico

Pesquisa Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octávio Frias de Oliveira"
Av. Dr. Arnaldo, 251, 12º Andar, Sala 5, Cerqueira César, São Paulo – SP, 01246-000 Brasil
Telefone: 55 11 3983-2691, Fax: 55 11 3893-3504
www.icesp.org.br

Anexo 5 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina em da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **28/09/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **362/11** intitulado: “**PERFIL DE EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA DE CANAL ANAL E CORRELAÇÃO COM FALHA AO TRATAMENTO COM QUIMIO-RADIOTERAPIA**” apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo ‘Octávio Frias de Oliveira

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Rachel Simões Pimenta Riechelmann
Paulo Marcelo Gehm Hoff

Pesquisador (a) Executante: Camila Motta Venchiarutti Moniz

CEP-FMUSP, 30 de Setembro de 2011.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 6 – Aprovação de emenda, referente às atualizações do projeto em 08/03/2017 - MM1200/16

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04 de Abril de 2017, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **362/11**, intitulado: **“Perfil de Expressão de Biomarcadores no Carcinoma de Canal Anal e Correlação com Falha ao Tratamento com Químio-radioterapia”** apresentado pelo **RADIOLOGIA E ONCOLOGIA**.

•MM 1200/16 - Emenda ao projeto

Pesquisador (a) Responsável: **Rachel Simões Pimenta Riechelmann; Paulo Marcelo Gehm Hoff**

CEP-FMUSP, 08 de Março de 2017

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 7 - Sequenciamento Genético - ΔCq

	n
Amostras com $1 \leq \Delta Cq \leq 3,99$	5
Amostras com $4 \leq \Delta Cq \leq 6,99$	12
Amostras com $6,99 \leq \Delta Cq \leq 9,99$	15
Amostras com $\Delta Cq \geq 10$	36
Indeterminado	2
Total	70

Anexo 8 - Sequenciamento Genético

Amostra	% Tumor	Número de cortes e espessura	Quantificação (ng/ul)	dcT	NGS	Cobertura média dos Amplicons
1	60	8/10	5,06	9,214	Analisável parcialmente	2.900x
2	30	3/10	17,1	12,882	Não realizado	-
4	40	3/10	11,8	10,219	Não realizado	-
5	40	5/10	38	5,028	Realizado	7.007x
6	20	8/10	5,88	9,365	Não analisável	-
7	40	8/10	0,676	16,457	Não realizado	-
8	70	3/10	50	4,573	Realizado	13.720x
9	70	8/10	13,1	10,906	Não realizado	-
10	60	8/10	4,29	16,440	Não realizado	-
11	50	8/10	29,4	11,052	Não realizado	-
12	40	3/10	52	4,407	Realizado	11.176x
13	30	8/10	3,02	12,539	Não realizado	-
14	80	8/10	0,364	17,297	Não realizado	-
15	50	5/10	10,3	10,892	Não realizado	-
16	50	5/10	6,79	8,392	Realizado	4.828x
17	20	3/10	56	5,664	Realizado	10.391x
18	60	8/10	1,26	14,040	Não realizado	-
19	50	5/10	4,96	11,159	Não realizado	-
20	20	8/10	2,99	15,912	Não realizado	-
21	60	8/10	42,9	4,970	Realizado	12.631x
22	50	5/10	0,349	NR	Não realizado	-
24	30	3/10	44	9,885	Analisável parcialmente	1.018x
25	50	4/10	15	5,652	Realizado	5672x
26	30	8/10	6,65	12,311	Não realizado	-
27	30	5/10	9,98	9,665	Não analisável	-
28	10	8/10	0,271	18,770	Não realizado	-
30	20	3/10	57	3,921	Realizado	13.039x
31	30	8/10	19,5	6,153	Realizado	6.184x
32	80	8/10	39,5	8,076	Realizado	3.135x
33	40	8/10	1,84	15,675	Não realizado	-
34	40	8/10	6,2	12,432	Não realizado	-
35	60	3/10	60	10,758	Não realizado	-
36	40	3/10	43,3	7,308	Realizado	1.462x
37	30	5/10	0,298	Indeterminado	Não realizado	-
38	40	3/10	28,4	6,986	Realizado	8.706x
39	30	8/10	20,3	8,905	Realizado	2.175x
40	50	3/10	54	8,291	Não analisável	-
41	20	8/10	0,454	15,617	Não realizado	-
42	60	8/10	19,6	6,913	Realizado	5.321x

continua

Anexo 8 - Sequenciamento Genético (conclusão)

Amostra	% Tumor	Número de cortes e espessura	Quantificação (ng/ul)	dcT	NGS	Cobertura média dos Amplicons
43	30	3/10	20,9	10,260	Não realizado	-
44	10	3/10	0,45	17,660	Não realizado	-
45	50	8/10	13,1	14,736	Não realizado	-
47	70	8/10	5,72	12,030	Não realizado	-
48	60	8/10	9,32	8,334	Realizado	1.462x
49	10	8/10	7,9	10,279	Não realizado	-
50	30	8/10	7,62	18,038	Não realizado	-
51	30	8/10	9,37	8,434	Realizado	2.017x
52	70	8/10	6,21	15,998	Não realizado	-
53	30	3/10	39,2	5,523	Realizado	11.073x
54	10	3/10	54	8,029	Realizado	8.008x
55	70	3/10	>600	3,463	Realizado	16.999x
56	30	8/10	0,534	12,842	Não realizado	-
57	30	8/10	17,5	6,371	Realizado	6.808x
58	20	8/10	7,4	11,772	Não realizado	-
60	30	3/10	11	7,926	Não analisável	-
61	50	8/10	9,67	12,628	Não realizado	-
62	20	8/10	12,8	8,465	Realizado	13.584x
63	40	3/10	7,7	11,061	Não realizado	-
64	20	8/10	2,41	13,692	Não realizado	-
65	40	3/10	>600	3,20	Realizado	11.903x
68	40	3/10	3,46	9,259	Não realizado	-
69	30	2/10	>600	10,229	Não realizado	-
71	40	4/10	1,29	12,283	Não realizado	-
72	70	4/10	13,9	12,601	Não realizado	-
73	60	3/05	3,27	13,212	Não realizado	-
74	70	3/10	16,7	3,235	Realizado	5.421x
75	60	6/05	1,25	10,467	Não realizado	-
76	40	3/10	36,1	5,315	Realizado	4.708x
77	40	3/10	30,2	11,296	Não realizado	-
78	70	6/05	42,9	2,086	Realizado	25.719x

Anexo 9 - Expressão de PD-L1, presença de HPV e HIV *status*

Amostra	Estadio	HIV	HPV	% PD-L1 Células Tumorais	% PD-L1 Infiltrado Linfocitário
1	IIIB	negativo	positivo	não expresso	5
2	IIIB	negativo	positivo	não expresso	não expresso
3	IIIB	negativo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
4	II	negativo	positivo	não expresso	8
5	IIIB	negativo	positivo	não expresso	1
6	IIIA	negativo	positivo	não expresso	não expresso
7	IIIA	negativo	negativo	não expresso	1
8	IIIB	negativo	positivo	não expresso	não expresso
9	II	negativo	positivo	não expresso	5
10	IIIB	negativo	negativo	não expresso	7
11	II	negativo	positivo	não expresso	não expresso
12	II	negativo	positivo	não expresso	não expresso
13	IIIA	negativo	positivo	não expresso	5
14	IIIA	negativo	positivo	não expresso	não expresso
15	II	negativo	negativo	não expresso	não expresso
16	II	negativo	positivo	não avaliado	não avaliado
17	IIIA	negativo	negativo	não expresso	não expresso
18	II	positivo	negativo	não expresso	3
19	II	negativo	positivo	não expresso	5
20	IIIA	negativo	positivo	não expresso	não expresso
22	II	negativo	negativo	não expresso	não expresso
23	IIIA	positivo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
24	IIIA	negativo	positivo	não expresso	não expresso
25	IIIB	positivo	positivo	não avaliado	não avaliado
26	IIIB	negativo	negativo	não expresso	não expresso
27	IIIB	negativo	negativo	não expresso	não expresso
28	IIIA	negativo	negativo	não expresso	5
29	II	negativo	não avaliado	20	sem infiltrado peritumoral
30	IIIA	negativo	positivo	30	5
31	IIIB	negativo	positivo	não expresso	não expresso
32	II	positivo	negativo	não expresso	7
33	IIIB	negativo	positivo	não expresso	não expresso
34	II	negativo	negativo	não expresso	não expresso
35	IIIB	negativo	positivo	50	não expresso
36	IIIB	positivo	positivo	não avaliado	não avaliado
37	IIIA	negativo	positivo	não avaliado	não avaliado
38	II	negativo	positivo	20	não expresso
39	IIIB	negativo	positivo	não expresso	não expresso
40	IIIB	negativo	positivo	não avaliado	não avaliado
41	II	negativo	positivo	não expresso	não expresso
42	IIIB	negativo	positivo	não expresso	2

continua

Anexo 9 - Expressão de PD-L1, presença de HPV e HIV *status* (conclusão)

Amostra	Estadio	HIV	HPV	% PD-L1 Células Tumorais	% PD-L1 Infiltrado Linfocitário
43	IIIB	negativo	positivo	não expresso	4
44	IIIB	negativo	positivo	não expresso	sem infiltrado peritumoral
45	II	negativo	positivo	não expresso	2
47	IIIB	negativo	negativo	não avaliado	não avaliado
48	IIIA	negativo	positivo	2	10
49	II	negativo	negativo	não expresso	não expresso
50	II	negativo	não avaliado	não expresso	sem infiltrado peritumoral
51	II	negativo	positivo	não expresso	3
52	II	negativo	positivo	não avaliado	não avaliado
53	II	positivo	positivo	2	10
54	IIIB	negativo	positivo	não expresso	não expresso
55	IIIB	negativo	negativo	não expresso	20
56	II	negativo	positivo	não expresso	não expresso
57	II	negativo	positivo	não avaliado	não avaliado
58	II	negativo	positivo	não expresso	2
59	IIIA	negativo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
60	IIIB	negativo	negativo	não expresso	3
61	II	negativo	positivo	não expresso	não expresso
62	IIIA	negativo	negativo	não expresso	não expresso
63	IIIA	negativo	positivo	não expresso	não expresso
64	IIIA	negativo	negativo	não expresso	não expresso
65	IIIA	positivo	positivo	não expresso	não expresso
66	IIIA	positivo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
67	IIIA	negativo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
68	IIIB	negativo	positivo	não expresso	não expresso
69	IIIB	negativo	positivo	não expresso	10
70	IIIB	negativo	não avaliado	não avaliado	não avaliado
71	II	negativo	negativo	10	não expresso
72	II	negativo	positivo	não expresso	5
73	IIIB	negativo	positivo	40	não expresso
74	IIIB	negativo	positivo	2	não expresso
75	IIIB	negativo	negativo	10	3
76	IIIB	positivo	negativo	não expresso	5
77	IIIB	negativo	positivo	não expresso	2

Anexo 10 - Pesquisa de Ki-67

Amostra	% Tumor	%Ki-67
1	60	1
2	30	70
4	40	50
5	40	60
6	20	40
7	40	20
8	70	60
9	70	80
10	60	50
11	50	70
12	40	50
13	30	40
14	80	30
15	50	40
16	50	20
17	20	70
18	60	80
19	50	80
20	20	10
21	60	40
22	50	20
24	30	50
26	30	70
27	30	20
28	10	30
30	20	90
31	30	30
32	80	80
33	40	10
34	40	10
35	60	70
36	40	30
38	40	40
39	30	70
40	50	90
41	20	5
42	60	30

continua

Anexo 10 - Pesquisa de Ki-67 (conclusão)

Amostra	% Tumor	%Ki-67
43	30	60
44	10	90
45	50	70
47	70	20
48	60	80
49	10	20
50	30	50
51	30	20
52	70	10
53	30	70
54	10	10
55	70	60
56	30	inconclusivo
57	30	10
58	20	50
60	30	30
61	50	40
62	20	60
63	40	50
64	20	80
65	40	80
68	40	50
69	30	90
71	40	70
72	70	70
73	60	50
74	70	60
75	60	80
76	40	80
77	40	90

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
2. de Souza DL, Curado MP, Bernal MM, Jerez-Roig J, Boffetta P. Mortality trends and prediction of HPV-related cancers in Brazil. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(4):380-7.
3. Fundação Oncocentro de São Paulo - Tabnet [homepage na internet]. [Acesso em 15/05/2017]. Disponível em: <http://www.fosp.saude.sp.gov.br>
4. Instituto Nacional José de Alencar Gomes da Silva 2013 [homepage na internet]. [Acesso em 15/05/2017]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
5. Gami B, Kubba F, Ziprin P. Human papilloma virus and squamous cell carcinoma of the anus. *Clin Med Insights Oncol*. 2014;8:113-9.
6. Fritsch H, Zehm S, Illig R, Moser P, Aigner F. New insights into the development and differentiation of the human anorectal epithelia. Are there clinical consequences? *Int J Colorectal Dis*. 2010;25(10):1231-42.
7. Leeds IL, Fang SH. Anal cancer and intraepithelial neoplasia screening: A review. *World J Gastrointest Surg*. 2016;8(1):41-51.

8. Bosman FT CF, Hruban RH. WHO Classification of tumours of the digestive system. Fourth ed. Lyon: IARC Press; 2010.
9. Franklin RA, Giri S, Valasareddy P, Lands LT, Martin MG. Comparative survival of patients with anal adenocarcinoma, squamous cell carcinoma of the anus, and rectal adenocarcinoma. *Clin Colorectal Cancer*. 2016;15(1):47-53.
10. Hoff PM, Coudry R, Moniz CM. Pathology of anal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017;26(1):57-71.
11. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015;7(7):3863-90.
12. Ostrbenk A, Kocjan BJ, Hosnjak L, Li J, Deng Q, Sterbenc A, et al. Identification of a novel human papillomavirus, type HPV199, isolated from a nasopharynx and anal canal, and complete genomic characterization of papillomavirus species gamma-12. *PloS One*. 2015;10(9):e0138628.
13. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, et al. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med*. 1997;337(19):1350-8.
14. Hellner K, Munger K. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(13):1785-94.

15. Graham DA, Herrington CS. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol Pathol*. 2000;53(4):201-6.
16. Madeleine MM, Finch JL, Lynch CF, Goodman MT, Engels EA. HPV-related cancers after solid organ transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2013;13(12):3202-9.
17. Legarth R, Helleberg M, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Pedersen C, et al. Anal carcinoma in HIV-infected patients in the period 1995-2009: a Danish nationwide cohort study. *Scand J Infect Dis*. 2013;45(6):453-9.
18. Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJ, Dai M, Thomas JO, Hieu NT, et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol*. 2008;37(3):536-46.
19. Shvetsov YB, Hernandez BY, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Ning L, et al. Duration and clearance of anal human papillomavirus (HPV) infection among women: the Hawaii HPV cohort study. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):536-46.
20. El-Haddad M, Ahmed RS, Al-Suhaibany A, Al-Hazza M, Al-Sanae N, Al-Jabbar AA, et al. Anal canal carcinoma treatment results: the experience of a single institution. *Ann Saudi Med*. 2011;31(2):158-62.

21. Nigro ND, Vaitkevicius VK, Considine B, Jr. Combined therapy for cancer of the anal canal: a preliminary report. *Dis Colon Rectum*. 1974;17(3):354-6.
22. Abbas A, Yang G, Fakih M. Management of anal cancer in 2010. Part 1: Overview, screening, and diagnosis. *Oncology (Williston Park)*. 2010;24(4):364-9.
23. Nigro ND, Seydel HG, Considine B, Vaitkevicius VK, Leichman L, Kinzie JJ. Combined preoperative radiation and chemotherapy for squamous cell carcinoma of the anal canal. *Cancer*. 1983;51(10):1826-9.
24. Northover J, Glynne-Jones R, Sebag-Montefiore D, James R, Meadows H, Wan S, et al. Chemoradiation for the treatment of epidermoid anal cancer: 13-year follow-up of the first randomised UKCCCR Anal Cancer Trial (ACT I). *Br J Cancer*. 2010;102(7):1123-8.
25. Flam M, John M, Pajak TF, Petrelli N, Myerson R, Doggett S, et al. Role of mitomycin in combination with fluorouracil and radiotherapy, and of salvage chemoradiation in the definitive nonsurgical treatment of epidermoid carcinoma of the anal canal: results of a phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol*. 1996;14(9):2527-39.
26. Peiffert D, Tournier-Rangeard L, Gerard JP, Lemanski C, Francois E, Giovannini M, et al. Induction chemotherapy and dose intensification of the radiation boost in locally advanced anal canal carcinoma: final analysis of the randomized UNICANCER ACCORD 03 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):1941-8.

-
27. Gunderson LL, Winter KA, Ajani JA, Pedersen JE, Moughan J, Benson AB, 3rd, et al. Long-term update of US GI intergroup RTOG 98-11 phase III trial for anal carcinoma: survival, relapse, and colostomy failure with concurrent chemoradiation involving fluorouracil/mitomycin versus fluorouracil/cisplatin. *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4344-51.
28. James RD, Glynne-Jones R, Meadows HM, Cunningham D, Myint AS, Saunders MP, et al. Mitomycin or cisplatin chemoradiation with or without maintenance chemotherapy for treatment of squamous-cell carcinoma of the anus (ACT II): a randomised, phase 3, open-label, 2 x 2 factorial trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):516-24.
29. Derissen EJ, Jacobs BA, Huitema AD, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Exploring the intracellular pharmacokinetics of the 5-fluorouracil nucleotides during capecitabine treatment. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81(5):949-57.
30. Souza KT, Pereira AA, Araujo RL, Oliveira SC, Hoff PM, Riechelmann RP. Replacing 5-fluorouracil by capecitabine in localised squamous cell carcinoma of the anal canal: systematic review and meta-analysis. *Ecancermedicalscience*. 2016;10:699.
31. Oliveira SC, Moniz CM, Riechelmann R, Alex AK, Braghirolli MI, Bariani G, et al. Phase II Study of capecitabine in substitution of 5-FU in the chemoradiotherapy regimen for patients with localized squamous cell carcinoma of the anal canal. *J Gastrointest Cancer*. 2016;47(1):75-81.

-
32. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology 2017. [homepage na internet]. [Acesso em 15/05/2017]. Disponível em: https://http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/anal.pdf.
33. Eng C, Chang GJ, You YN, Das P, Rodriguez-Bigas M, Xing Y, et al. The role of systemic chemotherapy and multidisciplinary management in improving the overall survival of patients with metastatic squamous cell carcinoma of the anal canal. *Oncotarget*. 2014;5(22):11133-42.
34. Morris VK, Salem ME, Nimeiri H, Iqbal S, Singh P, Ciombor K, et al. Nivolumab for previously treated unresectable metastatic anal cancer (NCI9673): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):446-53.
35. Glynne-Jones R, Sebag-Montefiore D, Meadows HM, Cunningham D, Begum R, Adab F, et al. Best time to assess complete clinical response after chemoradiotherapy in squamous cell carcinoma of the anus (ACT II): a post-hoc analysis of randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(3):347-56.
36. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Rock CE, Stewart AK, Ko CY, Halverson A. Outcomes and prognostic factors for squamous-cell carcinoma of the anal canal: analysis of patients from the National Cancer Data Base. *Dis Colon Rectum*. 2009;52(4):624-31.
37. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24-35.

38. Mai S, Welzel G, Ottstadt M, Lohr F, Severa S, Prigge ES, et al. Prognostic relevance of HPV infection and p16 overexpression in squamous cell anal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;93(4):819-27.
39. Zhang L, Wu J, Ling MT, Zhao L, Zhao KN. The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses. *Mol Cancer*. 2015;14:87.
40. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(8):627-44.
41. Chiosea SI, Grandis JR, Lui VW, Diergaarde B, Maxwell JH, Ferris RL, et al. PIK3CA, HRAS and PTEN in human papillomavirus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2013;13:602.
42. Chung JH, Sanford E, Johnson A, Klempner SJ, Schrock AB, Palma NA, et al. Comprehensive genomic profiling of anal squamous cell carcinoma reveals distinct genomically defined classes. *Ann Oncol*. 2016;27(7):1336-41.
43. Cacheux W, Rouleau E, Briaux A, Tsantoulis P, Mariani P, Richard-Molard M, et al. Mutational analysis of anal cancers demonstrates frequent PIK3CA mutations associated with poor outcome after salvage abdominoperineal resection. *Br J Cancer*. 2016;114(12):1387-94.

-
44. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*. 2017;47(5):765-79.
45. Grew D, Bitterman D, Leichman CG, Leichman L, Sanfilippo N, Moore HG, et al. HIV infection is associated with poor outcomes for patients with anal cancer in the highly active antiretroviral therapy era. *Dis Colon Rectum*. 2015;58(12):1130-6.
46. Fraunholz IB, Haberl A, Klauke S, Gute P, Rodel CM. Long-term effects of chemoradiotherapy for anal cancer in patients with HIV infection: oncological outcomes, immunological status, and the clinical course of the HIV disease. *Dis Colon Rectum*. 2014;57(4):423-31.
47. Yanik EL, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Succaria F, McMiller TL, Ascierto ML, et al. Association of HIV status with local immune response to anal squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy. *JAMA Oncol*. 2017 Mar 23.
48. Lampejo T, Kavanagh D, Clark J, Goldin R, Osborn M, Ziprin P, et al. Prognostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the anus: a systematic review. *Br J Cancer*. 2010;103(12):1858-69.
49. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-47.
50. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti III A; American Joint Committee on Cancer. *Cancer Staging Manual* 2010. New York: Springer; 2010.

-
51. Konski A, Garcia M, Jr., John M, Krieg R, Pinover W, Myerson R, et al. Evaluation of planned treatment breaks during radiation therapy for anal cancer: update of RTOG 92-08. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;72(1):114-8.
52. Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, et al. CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol*. 2003;13(3):176-81.
53. TruSight Tumor 26 Data Sheet [homepage na internet]. [Acesso em 01/11/2016]. Disponível em: http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_tumor.pdf.
54. The cBioPortal for Cancer Genomics [homepage na internet]. [Acesso em 01/11/2016]. Disponível em: <http://www.cbioportal.org>.
55. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)[®] [homepage na internet]. [Acesso em 01/11/2016]. Disponível em: <https://www.omim.org>
56. ExAC Browser (Beta) Exome Aggregation Consortium [homepage na internet]. [Acesso em 01/11/2016]. Disponível em: <http://exac.broadinstitute.org>.
57. CLINVITAE [homepage na internet]. [Acesso em 01/11/2016]. Disponível em: Available from: <http://clinvitae.invitae.com>

-
58. COSMIC: The catalogue of somatic mutations in cancer [homepage na internet]. [Acesso em 01/11/2016]. Disponível em: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
59. PapilloCheck® HPV-Screening [homepage na internet]. [Acesso em 01/11/2016]. Disponível em: http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/PapilloCheck/PapilloCheck_labinfo_1_6.pdf.
60. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 2013;310(20):2191-4.
61. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [homepage na internet]. [Acesso em 21/06/2016]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/boaspraticas_americanas.pdf.
62. Smaglo BG, Tesfaye A, Halfdanarson TR, Meyer JE, Wang J, Gatalica Z, et al. Comprehensive multiplatform biomarker analysis of 199 anal squamous cell carcinomas. Oncotarget. 2015;6(41):43594-604.
63. Casadei Gardini A, Capelli L, Ulivi P, Giannini M, Freier E, Tamberi S, et al. KRAS, BRAF and PIK3CA status in squamous cell anal carcinoma (SCAC). PloS One. 2014;9(3):e92071.
64. Juric D, Krop I, Ramanathan RK, Wilson TR, Ware JA, Sanabria Bohorquez SM, et al. Phase I dose-escalation study of taselisib, an oral

PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Discov.* 2017 Mar 22.

65. Patel H, Polanco-Echeverry G, Segditsas S, Volikos E, McCart A, Lai C, et al. Activation of AKT and nuclear accumulation of wild type TP53 and MDM2 in anal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2007; 121(12):2668-73.

66. Martin V, Zanellato E, Franzetti-Pellanda A, Molinari F, Movilia A, Paganotti A, et al. EGFR, KRAS, BRAF, and PIK3CA characterization in squamous cell anal cancer. *Histol Histopathol.* 2014;29(4):513-21.

67. Szturz P, Raymond E, Abitbol C, Albert S, de Gramont A, Faivre S. Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;111:39-51.

68. Ettl T, Viale-Bouroncle S, Hautmann MG, Gosau M, Kolbl O, Reichert TE, et al. AKT and MET signalling mediates antiapoptotic radioresistance in head neck cancer cell lines. *Oral Oncol.* 2015;51(2):158-63.

69. Peters S, Adjei AA. MET: a promising anticancer therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(6):314-26.

70. Reungwetwattana T, Liang Y, Zhu V, Ou SI. The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: the Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. *Lung Cancer.* 2017;103:27-37.

-
71. Pilotto S, Gkountakos A, Carbognin L, Scarpa A, Tortora G, Bria E. MET exon 14 juxtamembrane splicing mutations: clinical and therapeutical perspectives for cancer therapy. *Ann Transl Med.* 2017;5(1):2.
72. Mouw KW, Cleary JM, Reardon B, Pike J, Braunstein LZ, Kim J, et al. Genomic evolution after chemoradiotherapy in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2017;23(12):3214-22.
73. Tan SC, Ankathil R. Genetic susceptibility to cervical cancer: role of common polymorphisms in apoptosis-related genes. *Tumour Biol.* 2015;36(9):6633-44.
74. Beaudenon S, Huibregtse JM. HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC Biochemistry.* 2008;9 Suppl 1:S4.
75. Brady CS, Duggan-Keen MF, Davidson JA, Varley JM, Stern PL. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 12):3233-40.
76. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 1998;393(6682):229-34.
77. Van Damme N, Deron P, Van Roy N, Demetter P, Bols A, Van Dorpe J, et al. Epidermal growth factor receptor and K-RAS status in two cohorts of squamous cell carcinomas. *BMC Cancer.* 2010;10:189.

-
78. Paliga A, Onerheim R, Gologan A, Chong G, Spatz A, Niazi T, et al. EGFR and K-ras gene mutation status in squamous cell anal carcinoma: a role for concurrent radiation and EGFR inhibitors? *Br J Cancer*. 2012; 107(11):1864-8.
79. Prigge ES, Urban K, Stiegler S, Muller M, Kloor M, Mai S, et al. No evidence of oncogenic KRAS mutations in squamous cell carcinomas of the anogenital tract and head and neck region independent of human papillomavirus and p16(INK4a) status. *Hum Pathol*. 2014;45(11):2347-54.
80. Serup-Hansen E, Linnemann D, Hogdall E, Geertsen PF, Havsteen H. KRAS and BRAF mutations in anal carcinoma. *APMIS*. 2015;123(1):53-9.
81. Gilbert DC, Williams A, Allan K, Stokoe J, Jackson T, Linsdall S, et al. p16INK4A, p53, EGFR expression and KRAS mutation status in squamous cell cancers of the anus: correlation with outcomes following chemo-radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2013;109(1):146-51.
82. Schabath MB, Villa LL, Lin HY, Fulp WJ, Akogbe GO, Abrahamsen ME, et al. Racial differences in the incidence and clearance of human papilloma virus (HPV): the HPV in men (HIM) study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(10):1762-70.
83. Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, Smith JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer*. 2009;124(10):2375-83.

-
84. Cambou MC, Luz PM, Lake JE, Levi JE, Coutinho JR, de Andrade A, et al. Anal human papillomavirus (HPV) prevalences and factors associated with abnormal anal cytology in HIV-infected women in an urban cohort from Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Patient Care STDS*. 2015;29(1):4-12.
85. Yhim HY, Lee NR, Song EK, Kwak JY, Lee ST, Kim JH, et al. The prognostic significance of tumor human papillomavirus status for patients with anal squamous cell carcinoma treated with combined chemoradiotherapy. *Int J Cancer*. 2011;129(7):1752-60.
86. Ravenda PS, Magni E, Botteri E, Manzotti M, Barberis M, Vacirca D, et al. Prognostic value of human papillomavirus in anal squamous cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(5):1033-8.
87. Roldan Urgoiti GB, Gustafson K, Klimowicz AC, Petrillo SK, Magliocco AM, Doll CM. The prognostic value of HPV status and p16 expression in patients with carcinoma of the anal canal. *PloS One*. 2014;9(10):e108790.
88. Bulkman NW, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MC, van Kemenade FJ, Rozendaal L, et al. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer*. 2007;96(9):1419-24.
89. de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*. 2004;64(15):5449-55.

90. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res.* 2003;63(3): 636-41.
91. Govindarajan R, Gujja S, Siegel ER, Batra A, Saeed A, Lai K, et al. Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) expression in anal cancer. *Am J Clin Oncol.* 2016 Nov 15.
92. Allal AS, Alonso-Pentzke L, Remadi S. Apparent lack of prognostic value of MIB-1 index in anal carcinomas treated by radiotherapy. *Br J Cancer.* 1998;77(8):1333-6.
93. Indinnimeo M, Cicchini C, Stazi A, Limiti MR, Ghini C, Mingazzini P, et al. Immunohistochemical assessment of Ki-67 as prognostic cellular proliferation marker in anal canal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000;19(4):471-5.
94. Ajani JA, Wang X, Izzo JG, Crane CH, Eng C, Skibber JM, et al. Molecular biomarkers correlate with disease-free survival in patients with anal canal carcinoma treated with chemoradiation. *Dig Dis Sci.* 2010; 55(4):1098-105.
95. Grabenbauer GG, Matzel KE, Schneider IH, Meyer M, Wittekind C, Matsche B, et al. Sphincter preservation with chemoradiation in anal canal carcinoma: abdominoperineal resection in selected cases? *Dis Colon Rectum.* 1998;41(4):441-50.

-
96. Meyer JE, Panico VJ, Marconato HM, Sherr DL, Christos P, Pirog EC. HIV positivity but not HPV/p16 status is associated with higher recurrence rate in anal cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2013;44(4):450-5.
97. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Human papillomavirus-associated cancers: how many cancers are linked with HPV each year? [homepage na internet]. [Acesso em 21/06/2016]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/cases.htm>.
98. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. [homepage na internet]. [Acesso em 21/06/2016]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>.
99. Venchiarutti Moniz CM RR, Gansl RC. Câncer de canal anal. In: Lopes AC. *Tratado de Clínica Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Rocca; 2016. Cap. 271. p. 2341-3.
100. Portal Brasil [homepage na internet]. [Acesso em 21/06/2016]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/hpv/>.
101. Portal da Saúde SUS [homepage na internet]. [Acesso em 21/06/2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/22880-ministerio-da-saude-realiza-mobilizacao-para-incentivar-vacinacao-contr-hpv>.