

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES *TOLL-
LIKE 2 E 9*, E DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR MAPK38 E NFκBP65 NO
CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS**

FELIPE DA SILVA MARINHO

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interinstitucional em Oncologia da Fundação
Antônio Prudente em parceria com o Hospital de
Câncer de Pernambuco, para obtenção do título de
Doutor em Ciências
Área de Concentração em Oncologia**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientador: Dra. Leuridan Cavalcante Torres

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Marinho, Felipe da Silva

Avaliação da expressão de *TollLike Receptors (TLR)*, e fatores de transcrição MPKp38 e NFκBp65 em pacientes com carcinoma escamoso de pênis HPV positivos e negativos / Felipe da Silva Marinho - São Paulo, 2019.

86p.

Tese(Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco
Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Fatores de transcrição/genética/Transcription Factors/genetics.
2. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 3. Imunidade Inata/Immunity, Innate.
4. Papillomaviridae /Papillomaviridae. 5. Citometria de Fluxo/Flow Cytometry.
6. Estudos Transversais/Cross-Sectional Studies

"...O grande propósito de qualquer trabalho científico é deixar um conhecimento que poderá ajudar a humanidade por muitas gerações...cada um de nós contribuimos com um tijolinho na construção do conhecimento..."

Dra. Leuridan Torres (Abril/2019)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus filhos,
Beatriz e Luiz Felipe Marinho,
a grande razão de meus esforços.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, pela oportunidade de tê-lo como orientador;

À **Dra. Leuridan Torres**, pela exemplar dedicação à coordenação deste projeto cooperativo de pós-graduação;

A **Direção Geral do HCP e IMIP**, pelo apoio à realização do projeto;

À **Diretoria de Pesquisa do HCP**, pela oportunidade de participar deste programa cooperativo de pós-graduação;

Aos **Colegas Cirurgiões do Serviço de Urologia do HCP e colegas de projeto, Dr. Felipe Dubourcq e Dr. Mauro Marques**, pelo excelente apoio na coleta e condução dos casos;

Aos **Colegas pesquisadores do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP**, pelo auxílio e ensinamento, nas análises dos dados e processamento do material;

Aos meus **familiares**, pela compreensão nos momentos de ausência e contínuo estímulo, principalmente da minha mãe, **Ms. Tania Marinho** e irmã, **Dra. Júlia Marinho** pelo contínuo estímulo de nunca parar de estudar;

À meu pai, **Carlos Marinho** que, mesmo sem saber, sempre foi minha fonte de inspiração e incentivador a seguir a carreira médica;

À minha amada esposa **Luciana Marinho**, pela compreensão do tempo fora de casa;

À meus filhos, razões do meu viver, **Beatriz Dantas Marinho** e **Luiz Felipe Dantas Marinho**, por, inconscientemente, entenderem a importância de tudo que faço. Afinal, tudo é para eles.

À todas as pessoas que me incentivaram durante todo o período do doutorado a nunca baixar a cabeça e continuar buscando o conhecimento, para assim crescer como homem, cidadão e médico.

RESUMO

Marinho F. **Avaliação da expressão de *TollLike Receptors (TLR)*, e fatores de transcrição MPKp38 e NFκBp65 em pacientes com carcinoma escamoso de pênis.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Introdução: A modulação do processo inflamatório por TLRs pode ser um fator chave no desenvolvimento e progressão tumoral, induzindo tanto a respostas pró-tumorais, como anti-tumorais, muitas vezes através da regulação da sinalização pela NF-κB e subsequente produção de fatores de crescimento e proteínas anti-apoptóticas. A magnitude e duração da ativação dos TLRs são fundamentais para o desenvolvimento de um estado inflamatório pró-tumoral ou resposta anti-tumoral. O conhecimento de suas vias pode influenciar na aplicação clínica dos imunoterápicos como tratamento do carcinoma escamoso de pênis. Conseqüentemente, decidimos investigar a expressão de receptores TLR e fatores de transcrição em pacientes com câncer de pênis, ainda não descrito na literatura. **Objetivos:** Avaliar a expressão dos receptores *Toll-like 2* e *9*, e das vias de sinalização intracelular NF-κBp65 e MAPKp38 no carcinoma escamoso de pênis. **Métodos:** Foram incluídos um total de 38 pacientes masculinos com câncer de pênis, com idade ≥ 18 anos. Como grupo controle, foram incluídos 15 homens saudáveis. A concentração sérica de proteínas foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. Para análises estatísticas, foram utilizados os testes de *Mann-Whitney* e de correlação de *Spearman*. Foi considerado significativo $p < 0,05$. **Resultados:** Em sangue periférico, houve uma maior quantidade de leucócitos com expressão de TLR2 e MAPKp38 em pacientes, comparado aos controles saudáveis ($p=0,002$ e $p<0,0001$, respectivamente), enquanto os leucócitos que expressavam TLR9 e NFκB foram mais numerosos em controles saudáveis ($p=0,03$ e $p=0,03$, respectivamente). Em neutrófilos, havia um maior número com expressão de NFκBp65 e MAPKp38, em controles ($p=0,001$ e $p<0,0001$, respectivamente). Já nos monócitos, havia o maior número de células com

expressão de TLR9 e MAPKp38, em pacientes com câncer de pênis ($p=0,003$ e $p=0,01$, respectivamente). Nos pacientes com tumores $> 3,5$ cm, há um maior número de leucócitos totais que expressam TLR9, NF κ Bp65 e MAPKp38 ($p=0,01$; $p=0,008$ e $p=0,03$, respectivamente), uma maior quantidade de neutrófilos com expressão de TLR2 e NF κ Bp65 ($p=0,0008$ e $p=0,01$, respectivamente). Já em tumores $\leq 3,5$ cm, uma maior quantidade de monócitos expressavam NF κ Bp65 ($p=0,02$). Não houve diferença em leucócitos totais, na expressão dos receptores ou fatores de transcrição na avaliação de IPN (Invasão perineural), porém em pacientes com IPN+, havia um maior número de monócitos e neutrófilos com expressão de TLR9 ($p=0,009$ e $p=0,0003$, respectivamente). No tecido tumoral, houve uma maior expressão de TLR9 e NF κ Bp65 em pacientes com tumores $\leq 3,5$ cm ($p= 0,02$). Não foi observado correlação entre níveis de TLR2, TLR9 e NF κ Bp65 entre tecido tumoral e sangue periférico. No tecido tumoral, havia uma correlação positiva moderada entre TLR2 e TLR9 ($r=0.65$, $p=0.0009$) e TLR9 e NF κ Bp65 ($r=0.60$; $p=0.003$), além de correlação positiva alta entre TLR2 e NF κ Bp65 ($r=0.78$; $p<0.0001$). **Conclusão:** Existem alterações nos níveis sanguíneos de TLR2, TLR9, NF κ Bp65 e MAPKp38, em diferentes níveis, a depender do tipo celular, e em tecido tumoral que podem funcionar como fatores prognósticos e preditivos de tratamento para pacientes com CEC de pênis.

Descritores: Fatores de transcrição/genética. Neoplasias Penianas. Imunidade Inata. Papillomaviridae. Citometria de Fluxo. Estudos Transversais.

SUMMARY

Marinho F. [Evaluation of expression TollLike Receptors (TLR) and transcription factor p38 and MPK NFκBp65 in patients with squamous cell carcinoma of the penis]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Introduction: Modulation of the inflammatory process by TLRs may be a key factor in tumor development and progression, inducing both pro-tumor and anti-tumor responses, often through the regulation of NF-κB signaling and subsequent growth factor and anti-apoptotic proteins production. The magnitude and duration of TLR activation are critical for the development of a pro-tumor inflammatory state or anti-tumor response. Knowledge of its pathways may influence the clinical application of immunotherapeutics as a treatment for squamous cell carcinoma of the penis. Consequently, we decided to investigate the expression of TLR receptors and transcription factors in patients with penile cancer, not yet described in the literature.

Objectives: To evaluate the expression of Toll-like receptors 2 and 9, and the intracellular signaling pathways NF-κBp65 and MAPKp38 in squamous cell carcinoma of the penis. **Methods:** A total of 38 male patients with penile cancer, aged ≥ 18 years, were included. As a control group, 15 healthy men were included. Serum protein concentration was determined by the flow cytometry technique. For statistical analysis, the Mann-Whitney tests, and Spearman's correlation were used. It was considered significant $p < 0.05$. **Results:** In peripheral blood, there were more leukocytes expressing TLR2 and MAPKp38 in patients, compared to healthy controls ($p = 0.002$ and $p < 0.0001$, respectively), whereas leukocytes expressing TLR9 and NFκB were more numerous in healthy controls ($p = 0.03$ and $p = 0.03$, respectively). In neutrophils, there was a greater number with expression of NFκBp65 and MAPKp38, in controls ($p = 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). In monocytes, there were the highest number of cells expressing TLR9 and MAPKp38 in patients with penile cancer ($p = 0.003$ and $p = 0.01$, respectively). In patients with

tumors > 3.5 cm, there is a greater number of total leukocytes expressing TLR9, NFκBp65 and MAPKp38 (p = 0.01, p = 0.008 and p = 0.03, respectively), a higher amount of neutrophils with expression of TLR2 and NFκBp65 (p = 0.0008 and p = 0.01, respectively). Already in tumors ≤ 3.5 cm, a higher amount of monocytes expressed NFκBp65 (p = 0.02). There was no difference in total leukocytes, expression of the receptors or transcription factors in the IPN assessment, but in patients with IPN +, there was a higher number of monocytes and neutrophils with TLR9 expression (p = 0.009 and p = 0.0003, respectively) . In tumor tissue, there was a greater expression of TLR9 and NFκBp65 in patients with tumors ≤ 3.5 cm (p = 0.02). No correlation was found between levels of TLR2, TLR9 and NFκBp65 between tumor tissue and peripheral blood. In the tumor tissue, there was a moderate positive correlation between TLR2 and TLR9 (r = 0.65, p = 0.0009) and TLR9 and NFκBp65 (r = 0.60; p = 0.003), and a high positive correlation between TLR2 and NFκBp65 (r = 0.78; p <0.0001). **Conclusion:** There are changes in blood levels of TLR2, TLR9, NFκBp65 and MAPKp38, at different levels, depending on the cell type, and on tumor tissue that may function as prognostic and predictive factors of treatment for patients with penile SCC.

Keywords: Transcription / genetics factors. Penile Neoplasms. Immune Immunity. Papillomaviridae. Flow cytometry. Transversal Studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxa de câncer de pênis por país.....	2
Figura 2	Análise da incidência por câncer de pênis por região geográfica	2
Figura 3	Tumoração vegetante em glândula.....	4
Figura 4	Progressão da infecção pelo HPV e doença associada.....	12
Figura 5	Uma ilustração dos mecanismos de reconhecimento de antígenos não-próprio”, da “falta do próprio” e “de antígenos próprios induzidos ou alterados”	14
Figura 6	Ilustração dos receptores Toll-like e seus respectivos ligantes e mecanismos da resposta imune associados	16
Figura 7	Mecanismos anti-tumorais e pró-tumorais dos receptores de Toll-like	18
Figura 8	Receptores Toll-like e via de sinalização MyD88 e NF-KB.....	20
Figura 9	Vias de sinalização dos receptores Toll-like. Sinais TLRs de superfície celular ou do endossoma através de vias independentes do MYD88 (setas vermelhas) ou vias dependentes do MYD88 (setas pretas).....	24

Figura 10 Sinergismo entre os agonistas de TLRs e os inibidores de check points imunes	26
Figura 11 Reação de PCR para detecção da infecção viral por HPV	36
Figura 12 Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	38
Figura 13 Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de TLR2 e TLR9 no sangue periférico dos pacientes com invasão perineural (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis.....	46
Figura 14 Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de TLR2 e TLR9 no sangue periférico de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5\text{cm}$ (n=19) e $>3,5\text{cm}$ (n=19) no carcinoma escamoso de pênis	47
Figura 15 Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de NF κ Bp65 e MAPKp38 no sangue periférico dos pacientes com invasão perineural (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis	49
Figura 16 Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de NF κ Bp65 e MAPKp38 no sangue periférico de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5\text{cm}$ (n=19) e $>3,5\text{cm}$ (n=19) no carcinoma escamoso de pênis	50

Figura 17 Valores de mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR2, TLR9 e NFκBp65 dos pacientes com invasão perineural (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis	52
Figura 18 Valores de mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR2, TLR9 e NFκBp65 no tecido tumoral de grupos de pacientes com tamanho do tumor ≤ 3,5cm (n=19) e >3,5cm (n=19) no carcinoma escamoso de pênis	52
Figura 19 Análise da correlação entre os níveis de TLR2 vs TLR9, TLR9 vs NF-κB TLR2 vs NFκBp65 no tecido tumoral de pênis	53
Figura 20 Análise da correlação dos níveis TLR2, TLR9 e NFκBp65 no sangue e tecido tumoral de pênis. Spearman correlation test.....	54

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Comparação entre incidências de câncer de pênis nos estados brasileiros	3
Quadro 2	Os mais comuns subtipos patológicos de carcinoma escamoso de pênis e suas características clínico-patológicas.....	6
Quadro 3	Estudos clínicos em andamento com a combinação de inibidores de check points e agonistas de TLR.....	27
Quadro 4	Variáveis anatomopatológicas (7º Edição)	32
Tabela 1	Distribuição das frequências absolutas e relativas das características anatomopatológicas e parâmetros leucocitários de 38 pacientes com carcinoma escamoso de pênis, tratados no Hospital de Câncer de Pernambuco (2015-2017).....	42
Tabela 2	Análise dos níveis percentuais de leucócitos totais com expressão TLR 2, TLR 9, NFκBP65 e MAPKP38 no sangue periférico de pacientes e controles	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALR	Receptores AIM2- <i>like</i>
CEC	Carcinoma espinocelular
CIN	Neoplasia intraepitelial central
CLR	Receptores de Lecitina tipo-C
COX2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
DAMP	Padrões moleculares associados a perigo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	<i>Double stranded Deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	<i>Double stranded Ribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK1	<i>Extracellular Signal-regulated kinase-1</i>
ERK2	<i>Extracellular Signal-regulated kinase-2</i>
HCP	Hospital de câncer de Pernambuco
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMGB1	<i>High mobility group box-1 protein</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i>
IL	Interleucina
IMIP	Instituto de medicina integral de Pernambuco
IPN	Invasão perineural
JNK1	<i>c-Jun N-terminal kinase 1</i>
JNK2	<i>c-Jun N-terminal kinase 2</i>
JNK3	<i>c-Jun N-terminal kinase 3</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	Média de imunofluorescência
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLR	Receptores NOD- <i>like</i>
ORF	<i>Open Reading Form</i>
p53	<i>Tumor protein 53</i>

PAMP	Padrões moleculares associadas a patógenos
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRR	<i>Receptores de reconhecimento padrão</i>
RB1	<i>Retinoblastoma protein-1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ssRNA	<i>Single stranded Ribonucleic acid</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR	<i>Toll Like receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Carcinoma escamoso de pênis	1
1.1.1	Epidemiologia	1
1.1.2	Fatores de risco e características clinico-patológicas	3
1.1.3	Risco de recorrência linfonodal	7
1.1.4	Tratamento	8
1.2	Infecção pelo HPV e o carcinoma escamoso de pênis.....	9
1.3	Sistema imunológico e câncer.....	12
1.3.1	Receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRRs).....	15
1.3.2	Mecanismos anti-tumorais e pró-tumorais associados aos receptores Toll-like.....	16
1.3.3	Vias de sinalização intracelular associadas aos receptores Toll-like.....	19
1.4	Receptores Toll-like como alvos terapêuticos no câncer.....	22
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivo específico	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Detalhes do estudo	29
3.2	População do estudo.....	29
3.3	Procedimentos para seleção dos sujeitos, coleta dos dados e seguimento dos pacientes	30
3.3.1	Coleta de amostra de tecido tumoral.....	30
3.3.2	Coleta de amostra de sangue venoso.....	31
3.4	Critérios de elegibilidade	31
3.4.1	Critérios de inclusão.....	31
3.4.2	Critérios de exclusão.....	31
3.5	Definição dos termos e variáveis anatomopatológicas	32

3.6	Testes laboratoriais	33
3.6.1	Extração de DNA	33
3.6.2	Quantificação do DNA.....	34
3.6.3	Técnica de polymerase chain reaction (PCR) para detecção de HPV no tecido tumoral	35
3.6.4	Digestão enzimática do tecido tumoral.....	36
3.6.5	Técnica de citometria de fluxo.....	37
3.6.6	Determinação da expressão de MAPKp38, NFκBp65, TLR 2 e 9 no sangue periférico e no tecido tumoral por citometria de fluxo.	39
3.7	Análises estatísticas.....	40
3.7.1	Análise de associação.....	40
3.7.2	Análise de Correlação	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Descrição das características anatomopatológicas.....	41
4.2	Análises dos níveis de expressão dos receptores TLR2 e TLR9, e de NF-κBp65 e MAPKp38 no sangue periférico de pacientes e controles	43
4.3	Análise dos níveis TLR2 e TLR9 no sangue periférico e tecido tumoral.....	44
4.4	Análise da expressão de NFκBp65 e MAPKp38 no sangue periférico e tecido tumoral dos pacientes	48
4.5	Análise dos níveis TLR2, TLR9, MAPKp38 e NFκBp65 no tecido tumoral.	51
4.6	Correlação entre os níveis de expressão de TLR2, TLR9 e NFκBp65 tecido tumoral	53
4.7	Correlação dos níveis de expressão de TLR2, TLR9 e NFκBp65 entre o sangue periférico e tecido tumoral.....	54
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÕES	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco - HCP

Anexo 2 Sistema de estadiamento tumoral segundo a AJCC

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do paciente e do controle

Apêndice 2 Ficha clínica

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS

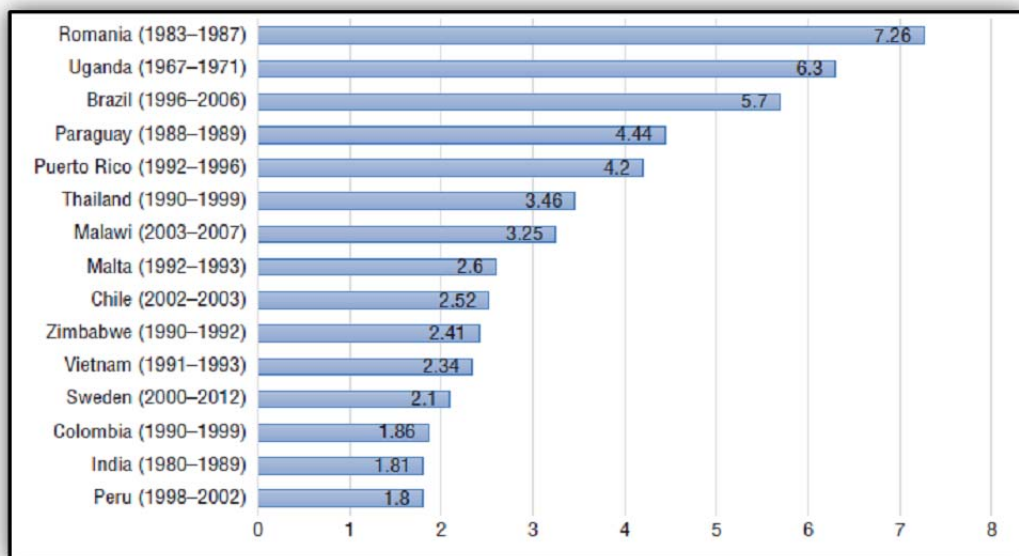
1.1.1 Epidemiologia

O câncer de pênis é uma neoplasia rara que acomete principalmente homens com idade entre 50 e 70 anos, sendo a taxa de incidência relacionada ao envelhecimento (HERNANDEZ et al. 2008). Geralmente acomete homens mais velhos, com idade média de 60 anos e aparentemente não apresenta predileção de raça, apesar de HERNANDEZ et al. (2008) ter observado nos Estados Unidos mais mortes e diagnósticos em idades mais precoces entre os negros.

De acordo com uma revisão sistemática, a incidência de câncer de pênis no mundo é de 0,84 casos/100.000 pessoas por ano. A maior taxa por idade e país de câncer de pênis foi na Romênia (7,26/100.000 pessoas-ano), e considerando os países da America Latina, o Brasil ocupa o primeiro lugar em incidência de câncer (5,7/100.000 pessoas-ano), seguido do Paraguai, Porto Rico e Chile (Figura 1). Na análise por área geográfica, a maior incidência foi na America Latina (1,40/100.000 pessoas-ano), África, Europa, America do Norte, Oceania e Ásia (Figura 2) (MONTES CARDONA 2017). Porém, considerando a incidência na população masculina, a Índia é um dos países com a maior incidência de câncer de pênis no mundo, sendo de 3,32 casos/100 000 homens (BURGERS et al. 1992).

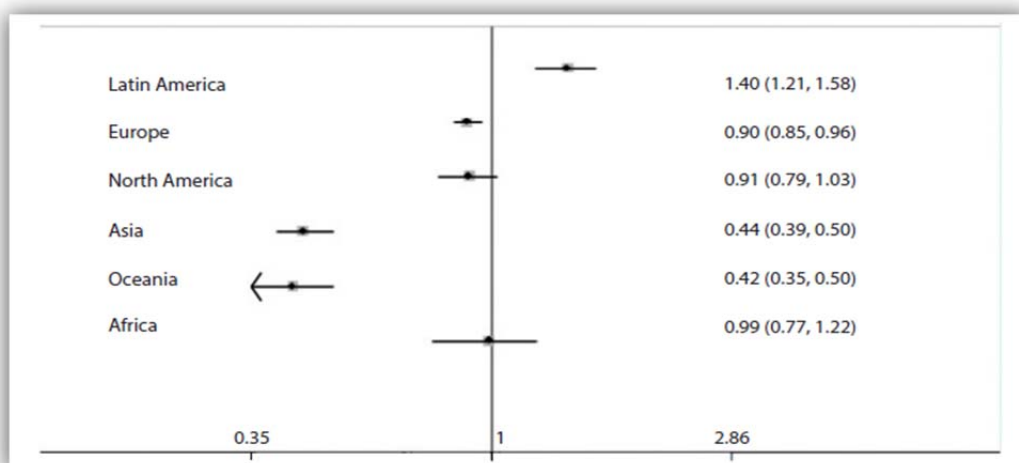
No Brasil, a incidência é muito maior entre as regiões Norte e Nordeste, podendo ser duas a três vezes maior que em regiões mais desenvolvidas, como a

região Sudeste (BRUMINI et al. 1982), porém as maiores inciências foram encontradas nessas regiões, explicado pela procura de assistência médica mais especializada, já que em algumas regiões do Brasil, o tratamento de câncer é heterogêneo e bastante precário (FAVORITO et al. 2008).



Fonte: Adaptado de MONTES CARDONA et al. (2017)

Figura 1 - Taxa de câncer de pênis por país



Fonte: Adaptado de MONTES CARDONA et al. (2017)

Figura 2 - Análise da incidência por câncer de pênis por região geográfica

Dentre os estados da região Norte e Nordeste, o Maranhão parece ter a maior incidência de casos de câncer de pênis no Brasil, chegando a 6,1/100.000 homens (COELHO et al. 2018). Em Pernambuco, a incidência é de 2,08/100.000 homens, com idade média de 61,2 anos, sendo a maioria de homens casados (57%) e analfabetos (43,2%) (DO COUTO et al. 2014). O quadro 1 mostra a incidência/100.000 homens em cinco Estados do Brasil, quatro deles, localizam-se nas regiões Norte e Nordeste.

Quadro 1 - Comparação entre incidências de câncer de pênis nos estados brasileiros

AUTOR	ESTADO	INCIDÊNCIA (100.000 HOMENS/ANO)
Coelho et al. 2018	Maranhão	1,18
Paiva et al. 2015	Bahia	0,72
Fonseca et al. 2010	Pará	0,46
do Couto et al. 2014	Pernambuco	0,34
Koifman et al. 2011	Rio de Janeiro	0,43

Fonte: Adaptado de COELHO et al. (2018)

1.1.2 Fatores de risco e características clínico-patológicas

Apesar de não haver uma fisiopatogenia bem definida, existem alguns fatores de risco que podem estar associados ao câncer de pênis como fimose, caracterizada pelo excesso de pele e impossibilidade de expor a glandula peniana, infecções por papilomavirus virus humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*) e vírus de imunodeficiência humano (HIV, do inglês *human immunodeficiency viral*). Outros fatores que também podem levar ao aumento do risco de câncer de pênis são o tabagismo, exposição ultravioleta, zoofilia e o esmegma (DILLNER et al. 2000; STERN 1990; VAN HOWE e HODGES 2006; MIRALLES-GURI et al. 2009; ZEQUI SDE et al. 2012).

Os tumores de pênis podem ter uma apresentação variável e heterogênea, sendo localizados principalmente na glândula (74% dos casos; Figura 3) (COELHO et al. 2018), contudo ainda podem ser encontradas no sulco coronal e no prepúcio (RITCHIE et al. 2004). Também é possível a detecção de linfonodo clinicamente palpável, porém, em algumas vezes, esses linfonodos não estão infiltrados por neoplasia, sendo reacional ao processo inflamatório/infeccioso que pode fazer parte do quadro clínico do paciente (HEYNS et al. 2010). O linfonodo acometido por neoplasia é encontrado em 54% dos pacientes. Mesmo assim, em 97,8% dos casos são diagnosticados como doença localizada, não metastática (COELHO et al. 2018).

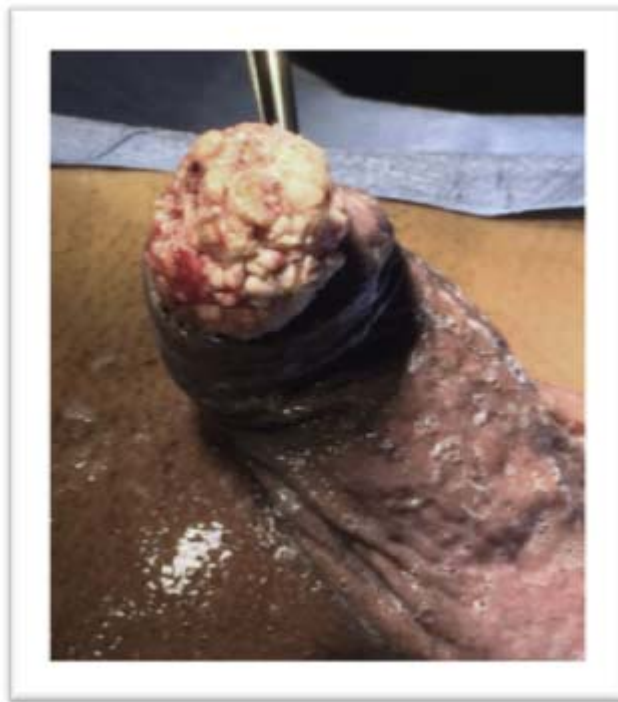


Figura 3 - Tumoração vegetante em glândula

A grande maioria dos tumores de pênis são carcinomas escamosos (95% dos casos) (MOCH et al. 2016). No Brasil, o tipo histológico mais frequente é o carcinoma escamoso de pênis (COELHO et al. 2018), sendo distribuídos em

diferentes subtipos histológicos devido a variação das características clínico-patológicas e distribuídos em dois grupos: tumores relacionados e não relacionados a infecção por HPV (MOCH et al. 2016).

Os tipos histológicos não relacionados ao HPV são o usual, carcinoma verrucoso, pseudoglandular, carcinoma circulatorum, carcinoma papilar, carcinoma adenoescamoso, carcinoma sarcomatóide e carcinoma misto. Entre os relacionados ao HPV, estão o carcinoma basalóide, carcinoma papilar basalóide, carcinoma de células claras, carcinoma linfoepitelioma-*like* e o carcinoma *Warty* (GUIMARÃES et al. 2009). No Quadro 2, estão descritas as principais características clínico-patológicas de alguns subtipos histológicos de câncer de pênis.

Quadro 2 - Os mais comuns subtipos patológicos de carcinoma escamoso de pênis e suas características clínico-patológicas

SUBTIPO HISTOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	REFERÊNCIA
NÃO RELACIONADO A INFEÇÃO POR HPV		
Carcinoma usual	É o mais comum e representa aproximadamente 50% dos CECs de pênis. Ele pode ter positividade para HPV na minoria das vezes, porém o mais frequente é ser negativo para sorologia do vírus. Apresenta uma mortalidade de 30% e seus principais fatores prognósticos são a graduação histológica e extensão da doença. Outros fatores de mal prognóstico são invasão perineural e angiolinfática, espessura tumoral maior que 10 mm, infiltração de corpo esponjoso e cavernoso e padrão de crescimento vertical.	GUIMARÃES et al. 2009; KAKIES et al. 2014; CHAUX et al. 2012
Carcinoma verrucoso	São quase que inteiramente HPV negativos. Corresponde a 2-3% das neoplasias de pênis Tem um aspecto papilomatoso e geralmente bem diferenciados. Apesar de poder recorrer em 30%, tem um bom prognóstico.	STANKIEWICZ et al. 2009
Carcinoma pseudoglandular	Geralmente de alto grau e apresentam-se com metástases linfonodais em 66% dos casos, além de uma alta mortalidade.	CUNHA et al. 2009
RELACIONADOS A INFEÇÃO POR HPV		
Carcinoma Basalóide	Corresponde a 5-10% dos tumores de pênis. Apresenta 80% de positividade para o HPV. É de alto grau, podendo ser bastante invasivo, apresentando invasão vascular e perineural. Devido a essas características, tem uma chance grande de metástases linfonodais, além de recorrência e morte.	GUIMARÃES et al. 2009
Carcinoma de células claras	Relacionado ao HPV e tem um prognóstico ruim, com mortalidade de aproximadamente 20%.	CHAUX et al. 2010
Carcinoma linfoepitelioma-like	Tem um prognóstico ruim e poucos casos foram relatados.	MENTRIKOSKI et al. 2014
Carcinoma <i>warty</i>	Tem aspecto macroscópico de condiloma e se caracteriza por apresentar-se como lesão em couve-flor. Geralmente, não dissemina para linfonodos e tem baixa mortalidade câncer-específica.	MANIPADAM et al. 2013

CEC: Carcinoma espinocelular; HPV: Papiloma vírus humano

1.1.3 Risco de recorrência linfonodal

Os principais fatores associados ao risco de metástases linfonodais são o estadiamento tumoral, o grau histológico e a presença ou ausência de invasão linfovascular ou perineural, por isso ter a estimativa do risco de doença linfonodal pode ajudar no direcionamento do tratamento, assim como estimar riscos de recorrência local ou a distância (PETTAWAY et al. 2017).

O envolvimento das estruturas pode inferir uma importância prognóstica grande já que a depender de até onde haja invasão tumoral, a chance de acometimento linfonodal torna-se maior. A invasão superficial pelo tumor (T1) tem uma chance estimada de acometimento linfonodal de 4-14% (CLARK et al. 2013; SUN et al. 2015). Essa chance aumenta para 33-35,8% quando há invasão de corpo esponjoso e 48,6-52,5%, quando há invasão de corpo cavernoso (LEIJTE et al. 2008; SUN et al. 2015).

O tamanho do tumor não é reconhecido como um fator prognóstico relevante, apesar de que o tamanho pode inferir um tumor mais invasivo e conseqüentemente, estágio avançado da doença (MORENO-RAMÍREZ et al. 2015). O grau histológico pode ser considerado como um fator prognóstico importante para metástases linfonodais. A depender da graduação histológica, as taxas de comprometimento linfonodal passam de 0-48%, no grau 1, 32-79%, no grau 2, até 47-100% no grau 3 (FICARRA et al. 2010).

Os comprometimentos de vasos e nervos tornaram-se fatores prognósticos importantes e foram incorporados ao estadiamento do tumor de pênis, sendo a presença dessas alterações associada a um maior risco de comprometimento linfonodal (PANER et al. 2018). Em tumores superficiais, o fato do paciente

apresentar algumas dessas alterações faz com que a chance de metástase linfonodal aumente de 10,5 a 18,1% para 33,3 a 50% (CLARK et al. 2013; SUN et al. 2015). COELHO et al. (2018) relataram que a invasão angiolinfática está associada ao pior prognóstico, porém a invasão perineural não foi relacionada a sobrevida livre de progressão. VELAZQUEZ et al. (2008) reportaram a invasão perineural como fator prognóstico importante, com risco de linfonodos comprometidos próximo a 80%, quando associado a grau histológico III.

1.1.4 Tratamento

O tratamento cirúrgico é o padrão para os pacientes portadores de CEC de pênis. A extensão da cirurgia vai ser definido de acordo com estadiamento tumoral e risco de doença linfonodal ou de recorrência da doença, podendo-se partir desde tratamento cirúrgicos mais conservadores com cirurgias menos mutilantes (PHILIPPOU et al. 2012), até tratamentos mais radicais, como a penectomia associada a linfadenectomia inguinal bilateral (ORNELLAS et al. 2008; SOLSONA et al. 2010).

A metástase linfonodal é o principal fator de risco relacionado a sobrevida do paciente com câncer de pênis, com chances de recorrência que podem chegar a 30% em pacientes com linfonodo comprometido e mortalidade de 34-100% em 5 anos, a depender da região linfonodal acometida (PANDEY et al. 2006; ORNELLAS et al. 2008; MARCONNET et al. 2010). A dissecação linfonodal deve ser realizada quando houver linfonodo acometido comprovado inicialmente ou quando houver um alto risco de recorrência linfonodal (COBLENTZ e THEODORESCU 2002; KROON et al. 2005).

A quimioterapia e radioterapia tem seus papéis mais bem estabelecidos na doença avançada, porém ainda sem uma definição bem consolidada sobre o melhor período de indicação e como devem ser realizadas (SHARMA et al. 2015; ROBINSON et al. 2018).

1.2 INFECÇÃO PELO HPV E O CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS

A infecção pelo HPV é a mais comum infecção sexualmente transmissível nos Estados Unidos. A partir dos estudos de associação do desenvolvimento do câncer cervical foram identificados alguns genótipos de HPV de alto risco e de baixo risco, classificados por sua oncogenicidade. Os genótipos de alto risco incluem HPV16, 18, 33 e 35, enquanto os de baixo risco incluem HPV 6 e 11. Apesar da infecção por HPV ser a causa da grande maioria do câncer cervical, porém é a causa somente de uma fração do carcinoma de pênis (CATES 1999; MUÑOZ et al. 2003).

Alguns estudos avaliaram a prevalência de infecção pelo HPV nos homens, e mostraram a frequência de 20% de detecção de HPV nas amostras coletadas da região anogenital masculina. A prevalência de infecção pelo HPV em homens adultos parece ser constante independente da faixa etária, sem mostrar um declínio em homens idosos, como é observado em mulheres idosas (DUNNE et al. 2006; ANIC et al. 2011).

Nos homens, a infecção pode causar verrugas genitais, neoplasia intraepitelial peniana (PeIN) e carcinomas de pênis. A PeIN é uma doença associada à infecção

pelo HPV e foram classificadas semelhante ao carcinoma de células escamosas in situ, sendo a PeIN uma lesão pré-maligna displásica (ANIC et al. 2011).

Em 2001, alguns autores relataram uma frequência de 90% de HPV nas lesões de PeIN, sendo que 40,7% era HPV 16 (RUBIN et al. 2001). Nesse sentido, ANIC et al. (2011) mostraram que a frequência de HPV nas lesões PeIN foi de 60% a 100%. Em seguida, surgiram outros estudos que relataram a detecção de HPV em 25% dos 212 casos de câncer de pênis analisados, desses, 79% eram do genótipo HPV 16 (DJAJADININGRAT et al. 2015).

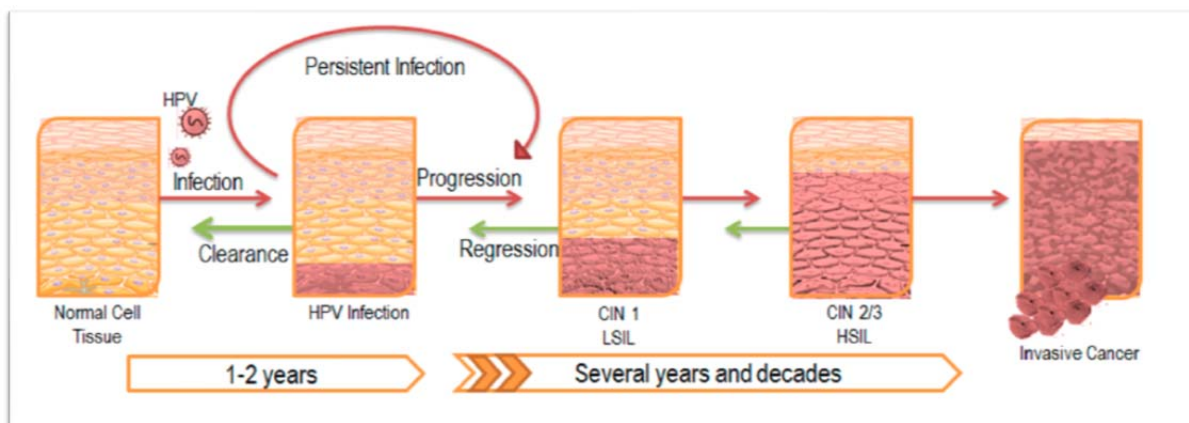
Num amplo estudo sobre frequência de detecção de HPV num total de 1010 amostras de tumores invasivos de pênis de diferentes áreas geográficas do mundo, mostrou que 33,1% dessas amostras eram positivas para HPV, destas, 70% eram dos genótipos de HPV 16 e 18. Quando avaliado as amostras de tumores de pênis dos países da América Latina, o HPV estava presente em 36,5% das amostras. Essa prevalência variou de acordo com o subtipo histológico e foi bem mais frequente nos carcinomas de células escamosas tipo basalóide verrucoso (ALEMANY et al. 2016).

Em um estudo multicêntrico, prospectivo e longitudinal sobre a infecção pelo HPV em homens mostrou que o tempo mediano para a resolução da infecção pelo HPV foi de 7,5 meses, mas na infecção pelo genótipo HPV16, o tempo para eliminação do vírus foi mais longo, de 12,2 meses. Quando os vírus não são eliminados, mais comumente, surgem as verrugas genitais. Embora as verrugas sejam benígnas e tipicamente assintomáticas, as lesões podem se tornar problemáticas, com dor, prurido e sangramento. As verrugas também podem se tornar maiores e se espalhar para novos locais. As verrugas genitais são altamente

infecciosas e até 64% dos parceiros sexuais acabarão por desenvolver também verrugas (ORIEL, 1971).

Apesar de uma grande parte da população está infectada pelo HPV, apenas 10 a 15% dos indivíduos infectados estabelecem uma infecção persistente ao longo da vida, pois na maioria dos indivíduos infectados, a infecção pelo HPV é eliminada pelo sistema imunológico no primeiros 12 a 24 meses. Apenas uma pequena parcela da população tem potencial para desenvolver um carcinoma (PENG et al. 2007; XI et al. 2009). Estabeleceu-se que a infecção persistente pelo HPV está associada com câncer cervical, anogenital e tumores de cabeça e pescoço (GILLISON et al. 2000; RADLEY et al. 2015).

Os indivíduos com infecção persistente pelo HPV ter uma maior chance de desenvolver células epiteliais anormais e, posteriormente, ter a formação do tumor no local da infecção (BOLDOGH et al. 1996; FRAZER 2009). Entretanto, de 10 a 20% dos indivíduos com infecções persistem de forma latente, podendo resultar em uma neoplasia intraepitelial central (CIN) que é classificada de acordo com a sua gravidade. Eventualmente, as lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (CIN 1) avançam para lesões intraepiteliais de alto grau (CIN 2), o que leva a formação do carcinoma (Figura 4). Apesar da regressão do tumor em resposta ao tratamento inicial (seta verde na Figura 4), a maioria dos casos de infecção latente não consegue eliminar completamente o vírus, e resultam eventualmente na recorrência da lesão (Figura 4) (SHANMUGASUNDARAM e YOU 2017).



Fonte: Adaptado de SHANMUGASUNDARAM e YOU (2017)

Figura 4 - Progressão da infecção pelo HPV e doença associada.

1.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E CÂNCER

As células tumorais são frequentemente rodeadas por um infiltrado de células inflamatórias, particularmente linfócitos e macrófagos. A partir de estudos em animal experimental, foi demonstrado que as células do sistema imune podem eliminar células tumorais, um processo chamado imunovigilância (EMENS et al. 2004; SMYTH et al. 2006).

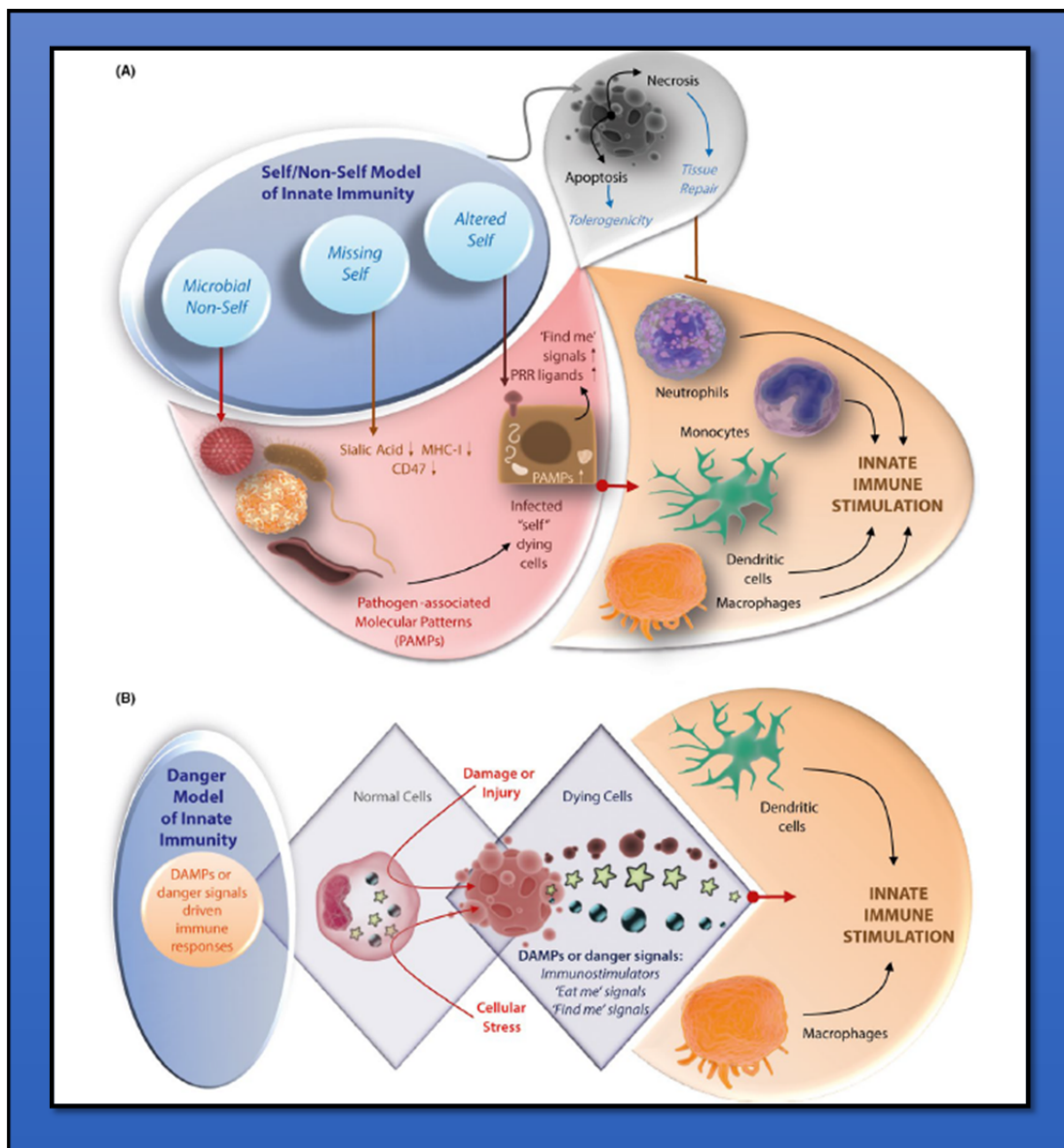
Alguns cientistas propuseram o conceito de imunovigilância do câncer há 50 anos. BURNET (1970) definiu da seguinte forma: "Em grandes animais de vida longa, como a maioria dos vertebrados de sangue quente, alterações genéticas hereditárias devem ser comuns em células somáticas e uma proporção dessas mudanças vai representar um passo em direção a malignidade. É uma necessidade evolutiva que deve haver algum mecanismo para a eliminação ou inativação de tais células mutantes potencialmente perigosas e é postulado que este mecanismo é de caráter imunológico (BURNET 1970). Porém, um conceito oposto e muito influente foi proposto por BALKWILL e MANTOVANI em 2001, sugerindo que as células

imunes e citocinas inflamatórias encontradas no microambiente tumoral podem promover a progressão tumoral, ao invés de suprimir o crescimento do tumor (MANTOVANI et al. 2008; FRIDMAN et al. 2012).

O sistema imunológico é composto pela imunidade inata e adaptativa, segundo MEDZHITOV e JANEWAY (2002), o sistema imune inato evoluiu para discriminar entre o “próprio” e “não-próprio”, em que “próprio” sempre se refere às células do organismo ou auto-antígenos e “não-próprio” refere-se a todos os antígenos externos ou estranhos, por exemplo, patógenos, bactérias, vírus, e o reconhecimento desses antígenos estranhos promove a ativação da resposta imune (Figura 5A) (MATZINGER 2002; MEDZHITOV e JANEWAY 2002).

As células da imunidade inata usam três estratégias de reconhecimento antigênico, ou seja, reconhecimento do “antígenos não-próprio”, da “falta do próprio” e “de antígenos próprios induzidos ou alterado”. Os antígenos não-próprio referem-se principalmente a antígenos microbianos ou padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*), isto é padrões moleculares conservados que constituem uma parte essencial da fisiologia microbiana (bacteriana, viral, fúngica) como os lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativa, peptoglicanos nas bactérias Gram-positivas, e o genoma viral (RNA/DNA) (MATZINGER 2002).

Além do reconhecimento dos PAMPs, alguns autores mostraram que existem mecanismos de resposta imune para antígenos oriundos de danos/injúria tecidual, sendo denominado padrões moleculares associados a injúria tecidual (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern*) e essas moléculas ativam o sistema imune de forma análoga ao PAMPs (Figura 5B).



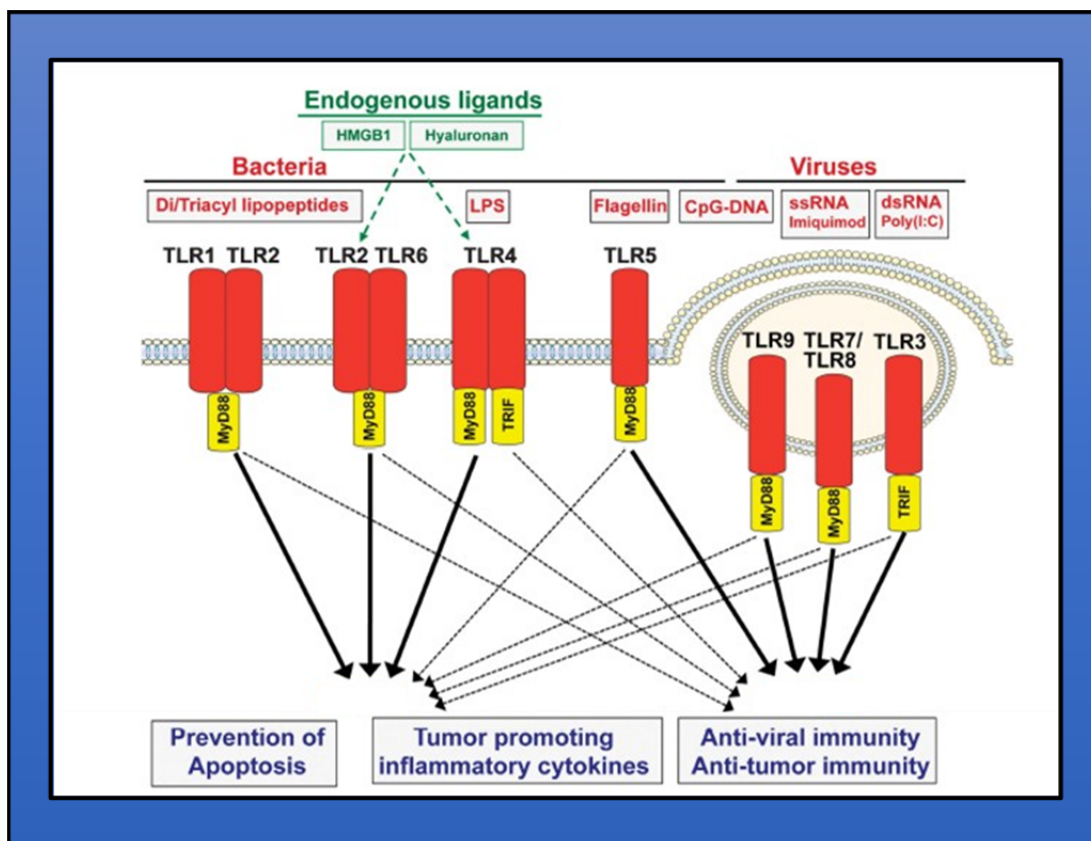
Fonte: Adaptado de GARG e AGOSTINIS (2017)

Figura 5 - Uma ilustração dos mecanismos de reconhecimento de antígenos não-próprio”, da “falta do próprio” e “de antígenos próprios induzidos ou alterados” (A) e dos padrões moleculares associados a danos (DAMPs) da resposta imune; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos. PRR: receptores de reconhecimento de padrões moleculares.

1.3.1 Receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRRs)

Os receptores Toll-like (TLRs) são os mais bem caracterizados PRRs para a detecção PAMPs, e a sua ativação desencadeia a produção de vários mediadores pró-inflamatórios por meio da ativação das vias de sinalização intracelular durante ao processo inflamatório inicial. No entanto, se os patógenos não puderem ser eliminados, eles podem promover um processo inflamatório crônico, que também pode ser mediada por TLRs (GOLDSZMID e TRINCHIERI 2012; NEWTON e DIXIT 2012). A importante contribuição da inflamação para a carcinogênese é melhor exemplificada pelas elevadas taxas de câncer colorretal na doença inflamatória intestinal, de câncer gástrico em pacientes infectados pela *Helicobacter pylori* e de carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite crônica (TRINCHIERI 2012).

Estruturalmente, os TLRs apresentam um domínio extracelular rico em leucina e uma região homóloga ao receptor Toll-interleucina 1 (IL-1) em sua porção intracelular. Foram descritos 10 receptores Toll-like em humanos: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 que são expressos na superfície celular, e os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 que são encontrados exclusivamente nos endossomas (Figura 6). O TLR2 reconhece as lipoproteínas bacterianas, o TLR3, moléculas de RNA de cadeia dupla, TLR4, lipopolissacarídeos (LPS), TLR5, flagelina, TLR7, moléculas de RNA de cadeia simples, e TLR9, moléculas de DNA não metiladas contendo “ilhas CpG” (CpG-ODN) (POLTORAK et al. 1998; ALIPRANTIS et al. 1999; HEMMI et al. 2000; ALEXOPOULOU et al. 2001; HAYASHI et al. 2001; HEIL et al. 2004) (Figura 6).



Fonte: Adaptado de PRADERE et al. (2014).

Figura 6 - Ilustração dos receptores Toll-like e seus respectivos ligantes e mecanismos da resposta imune associados.

1.3.2 Mecanismos anti-tumorais e pró-tumorais associados aos receptores Toll-like

A infecção viral é uma importante causa de câncer, sendo responsável por contribuir por uma de cada cinco neoplasias em todo o mundo (PARKIN 2006; DE MARTEL e FRANCESCHI 2009). A resposta imune anti-infecciosa via ativação dos receptores Toll-like é fundamental para o desenvolvimento de tumores. A falta de modulação do processo inflamatório pelos TLRs pode levar ao desenvolvimento e progressão tumoral. A ativação dos receptores de TLR3, TLR5, TLR7/TLR8 e TLR9 tem efeitos antitumorais, deslocando os mecanismos de tolerância imunológica para aqueles associados a resposta antitumoral, com ativação das células dendríticas, que

por sua vez, produzem Interferon (IFN) do tipo I, mediador inflamatório fundamental para ativação das células NK e linfócitos TCD8+ (T citotóxicas), sendo essas as principais células efetoras da resposta anti-tumoral. Também as células dendríticas produzem IL-6 que bloqueiam a diferenciação de células T reguladoras e os mecanismos de angiogêneses.

Por outro lado, a sinalização via TLRs aumenta a produção de citocinas inflamatórias que promovem o crescimento tumoral, dependentes da via do fator de transcrição NF- κ B, como interleucina 1 β , *Fator de Necrose Tumoral Alfa* (TNF α) e IL-6. A ativação de NF- κ B inibe a apoptose de células tumorais, pois esse fator de transcrição regulam a expressão de genes anti-apoptóticos (Figura 7) (RIDNOUR et al. 2013; PRADERE et al. 2014).

As células tumorais também podem expressar receptores Toll-like, ativação de TLRs nessas células pelos DAMPs induz a produção de citocinas e quimiocinas, fatores pró-angiogênicos e de crescimento celular, e de proteínas anti-apoptóticas que continuam a aumentar a sobrevivência e progressão do tumor (SATO et al. 2009; RIDNOUR et al. 2013; PRADERE et al. 2014).

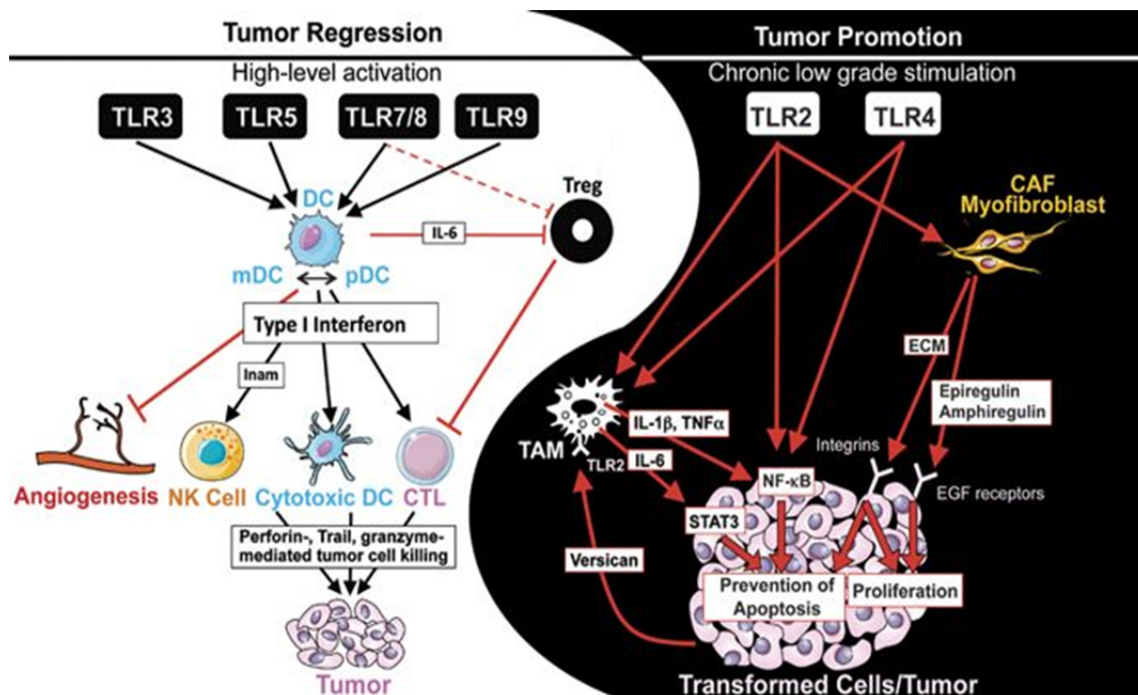


Figura 7 - Mecanismos anti-tumorais e pró-tumorais dos receptores de Toll-like.

Os vários TLRs têm papéis diferentes na carcinogênese, TLR4 mostra efeitos pró-tumorais, pois em camundongos deficientes em TLR4, houve redução do risco de desenvolvimento de tumores gastrointestinal e hepatocelular (FUKATA et al. 2007; YU et al. 2013). A atividade pró-tumoral do TLR4 é principalmente devido a sua expressão em células tumorais onde medeia a resistência dessas células aos danos causados pelos linfócitos T citotóxicos (HUANG et al. 2005; YU et al. 2013). O TLR9 expresso em células tumorais foi associado com o aumento da proliferação celular e invasão (REN et al. 2007; TANAKA et al. 2010).

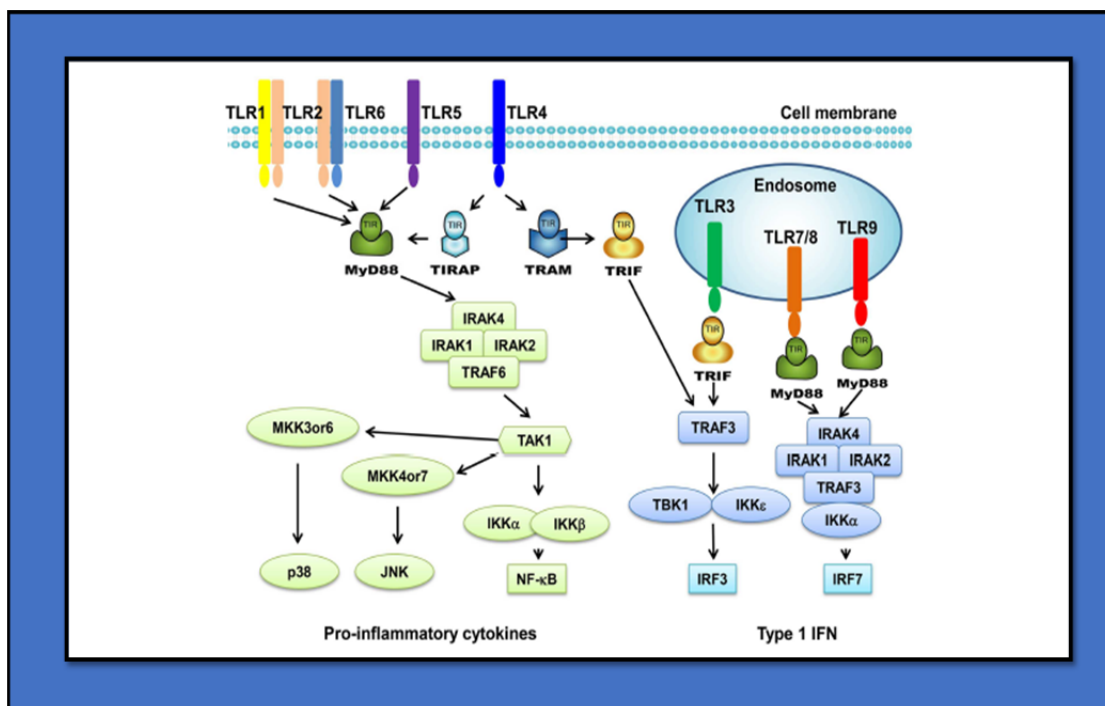
A redução da ativação de TLR2 levou a um aumento da proliferação celular e diminuição da apoptose, em um modelo de camundongos com câncer colorretal (LOWE et al. 2010). O mecanismo pelo qual o TLR 2 induz a supressão do tumor é sugerido ser mediada através das moléculas HMGB1 derivado de tumor (DAMPs),

no qual ativa as células dendríticas presentes no microambiente tumoral via receptores TLR2, levando a eliminação de células do tumor (CURTIN et al. 2009).

1.3.3 Vias de sinalização intracelular associadas aos receptores Toll-like

A via de sinalização dos receptores Toll-like está bem estabelecida nas células da imunidade inata. A interação do TLR com o ligante promove o recrutamento de uma ou mais proteínas adaptadoras, como MyD88 e *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF). O envolvimento de MyD88 ativa as tirosina cinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK), que interage com *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6), resultando na ativação das vias de sinalização de *Mitogen activated protein kinases* (MAPK) e NF-kB. A proteína TRIF é recrutada após estimulação e leva à ativação de NF-kB com produção de IFN tipo I (ZHAO et al. 2014).

As moléculas NF-kB são constitutivamente expressas em vários tumores humanos e a sua ativação é fundamental para a carcinogênese. As mutações de NF-kB foram descritas nos linfomas de células B humanas. Sugere-se que o NF-kB estar ligado ao processo de carcinogêneses devido a capacidade de induzir a expressão moléculas de adesão, metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias, tornando o microambiente favorável a sobrevivência das células tumorais (WILLIAMS et al. 2008; MEYER et al. 2011; KIPANYULA et al. 2013; WANG JQ et al. 2014) (Figura 8).



Fonte: Adaptado de ZHAO et al. (2014)

Figura 8 - Receptores Toll-like e via de sinalização MyD88 e NF-κB.

A depender dos diversos estímulos e vias seguidas, faz com que o NFκB possa ter tanto função supressora tumoral, como também promotora. A mutação de genes como RAS, EGFR e HER-2 podem levar a ativação do NFκB em tumores sólidos (CHATURVEDI et al. 2011). Da mesma forma, a contínua liberação de quimiocinas e citocinas por macrófagos no microambiente tumoral também estimula a via de sinalização do NFκB. Todas essas sinalizações podem implicar em aumento de sobrevivência celular e inibição de apoptose. Também podem estimular genes reguladores de proliferação, como ciclina D1 e C-MYC, genes envolvidos em metástases, angiogênese e imortalidade celular (LA ROSA et al. 1994; PERKINS 1997; GUTTRIDGE et al. 1999; XIE et al. 2010).

As MAPK pertencem a uma família de cinases intracelulares altamente conservadas que transduzem sinais extracelulares transmitidos por receptores de

superfície ou vários tipos de danos. Três subfamílias existem em mamíferos e incluem ERK, JNK e p38 sendo que quatro isoformas (α , β , γ e δ) constituem a família p38. Inicialmente, foram identificadas como reguladores da expressão de diferentes citocinas inflamatórias. Além disso, p38MAPK desempenha importantes funções na proliferação celular, por ativar os “checkpoints” do ciclo celular (G1/S e G2/M). A isoforma p38 α pode promover parada do crescimento pela regulação negativa da ciclina D1 e pela ativação do p53, como também inibir a transformação por detecção de estresse oxidativo induzido por oncogene (ELLINGER-ZIEGELBAUER et al., 1999). Apesar desses avanços, ainda não está claro como a sinalização da p38 α é regulada especialmente durante a progressão do câncer para suprimir a tumorigênese e a disseminação das células tumorais.

Os estudos realizados com camundongos geneticamente deficientes de uma ou mais isoformas de p38 mostraram a importância das isoformas γ e δ na resposta imune inata e na inflamação (KAWAI e AKIRA 2007).

O importante papel da MAPK p38 α na resposta imune inata e na inflamação tem sido descoberto principalmente por estudos que utilizam inibidores da p38 α (CUENDA e ROUSSEAU 2007; GAESTEL et al. 2009; ARTHUR e LEY 2013). De forma geral, o p38 α é considerado supressor tumoral, pois parece ter um papel regulatório negativo na progressão do ciclo celular e também pode induzir a apoptose (BULAVIN e FORNACE 2004; XU et al. 2014). Porém vários outros dados vem corroborando que a MAPKp38 também podendo ter papel ativo na proliferação celular, agressividade tumoral, angiogênese, invasividade e metástases (DREISSIGACKER et al. 2006; CHEN et al. 2009).

Os macrófagos deficientes das isoformas γ e δ apresentaram redução dos níveis de ativação das vias MKK1-ERK1/2 e na produção de citocinas inflamatórias (RISCO et al. 2012). A produção de TNF α , IL-1 β e IL-10 por macrófagos de camundongos deficientes em p38 γ/δ foi bem reduzida, porém foi observado aumento dos níveis de IL-12 e IFN- β (LAVOIE et al. 1996; TAKENAKA et al. 1998; BULAVIN et al. 2002, 2004; DOLADO et al. 2007; MAILLEUX et al. 2007; RISCO et al. 2012; BELOVA et al. 2005).

1.4 RECEPTORES TOLL-LIKE COMO ALVOS TERAPÊUTICOS NO CÂNCER

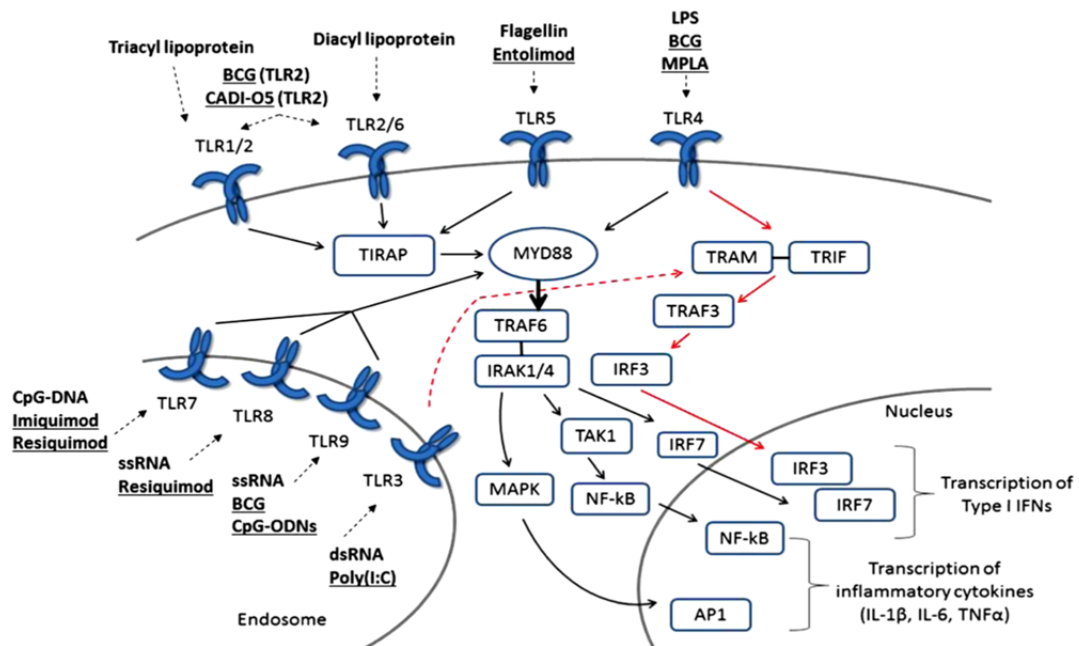
O papel do sistema imunológico na carcinogênese ainda precisa ser melhor entendido, mesmo com todo o reconhecimento de que a sua influência pode ser contextualizada como direta no desenvolvimento do câncer. A ambiguidade do seu papel, no que diz respeito tanto na proteção das células sãs, como no efeito pró tumorigênico mostra toda a complexidade relacionada a sua interferência no sistema imunológico, relacionado ao tratamento das neoplasias (SCHREIBER et al. 2011). O processo de desenvolvimento tumoral e metástases está relacionado a inflamação e geralmente envolve tanto os sistemas imunes inato e adaptativo. Como parte importante do sistema imunológico inato, os receptores Toll like aparecem como peça fundamental, principalmente por ser o receptor de reconhecimento padrão mais bem estudado (AKIRA et al. 2006).

Apesar de todo conhecimento desses receptores, correlacionar esses princípios ao desenvolvimento de terapias dirigidas aos TLRs ainda gera dúvidas,

principalmente pelo dinamicismo dessas proteínas, já que alguns de seus ligantes podem "disparar" estímulos anti-tumorais em algumas neoplasias, como induzir a crescimento e desenvolvimento de metástases, em outros (BASITH et al. 2012; YU et al. 2013; PRADERE et. al. 2014).

Apesar de todos os efeitos as vezes contraditórios, o estudo de drogas que tem o TLR como alvo é uma oportunidade a ser explorada para o desenvolvimento de estratégias de tratamento imunológico contra tumores. Estas podem ser desde o uso de agonistas dos TLRs, com efeitos anti-tumorais diretos ou como um sinergismo ao uso de tratamentos imunomodulatórios, como vacinas (MATIJEVIC e PAVELIC 2010).

Os agonistas de TLRs (Figura 9) são fortes imunomoduladores que conseguem estimular o sistema imune inato de forma potente, influenciando numa resposta poderosa e duradoura adaptativa, através de linfócitos citotóxicos e maturação de células NK e células dendríticas (ADAMS 2009). Outros ligantes de TLRs também podem atuar como agentes tumoricidas diretamente (GOUTAGNY et al. 2012). Nas vacinas, esses ligantes tem o maior objetivo de potencializar a imunogenicidade, principalmente quando usados em combinação a outros tratamentos, como radioterapia, quimioterapia ou imunoterapia (IRIBARREN et al. 2016; CHIANG et al. 2011).



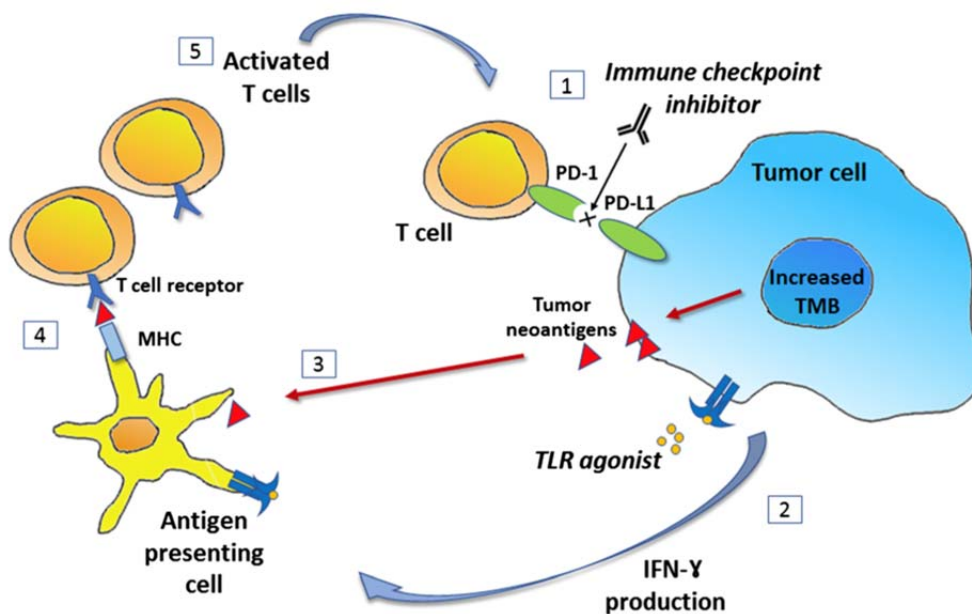
Fonte: Adaptado de BRAUNSTEIN et al. (2018).

Figura 9 - Vias de sinalização dos receptores Toll-like. Sinais TLRs de superfície celular ou do endossoma através de vias independentes do MYD88 (setas vermelhas) ou vias dependentes do MYD88 (setas pretas). A dimerização do receptor (heterodimerização para TLR1 / 2 e TLR2 / 6) leva a ativação da sinalização, levando fatores de transcrição ao núcleo e consequente tradução de fatores pró-inflamatórios. Exemplos de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que estimulam TLRs particulares são mostrados, juntamente com os agonistas de TLR que são aprovados pela FDA ou em ensaios clínicos (sublinhados). TIRAP (Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), MYD88 (myeloid differentiation factor 88), TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor), IRAK (IL-1 receptor-associated kinase- 4), IRF3 (interferon regulatory factor 3), TAK1 (transforming growth factor [TGF]- β -activated kinase 1), MAPK (mitogen-activated protein kinase), NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), AP1 (activator protein 1), IFN (interferon), IL (interleukin), TNF α (tumor necrosis factor alpha), FDA (US Food and Drug Administration).

Alguns agonistas de TLRs já são usados e aprovados para tratamento oncológico. O mais conhecido é a utilização do Bacillus Calmette-Guerin (BCG) para o tratamento dos tumores de bexiga superficiais (LAMM et al. 1991). Atua nos TLR2/4 por estímulo do componente de parede celular da micobactéria, como

também por estímulo de TLR9 pelo componente de DNA bacteriano (LARUE et al. 2013), ativando a produção de citocinas e estímulo de macrófagos e células dendríticas (TSUJI et al. 2000). Outro exemplo é o imiquimod, um composto sintético que ativa o TLR7 e tem um efeito anti-tumoral multifatorial, principalmente pelo recrutamento de macrófagos e células dendríticas plasmocitóides, ativadas por citocinas e quimiocinas (DROBITS et al. 2012). Está aprovada para tratamento de carcinoma basocelular de pele superficial (GEISSE et al. 2004).

Com o avançar do entendimento e benefícios do uso dos anti-PD1/PDL-1 e anti CTLA4 no tratamento de neoplasias, vem-se estudando a utilização da combinação dessas drogas com agonistas dos TLRs, imaginando um sinergismo dessas drogas (Figura 9). O racional da combinação dessas drogas é de aumentar a ativação de linfócitos T, pela inibição dos check points imunes, além de superar a resistência do bloqueio dos anti PD1/PD-L1, otimizando a apresentação de antígenos e intensificando a resposta imune adaptativa (BRAUNSTEIN et al. 2018). Vários estudos utilizando esse racional vêm sendo desenvolvidos e tão logo saíam esses dados, entenderemos se o racional foi confirmado pelos dados reais de tratamento (Quadro 3).



Fonte: Adaptado de BRAUNSTEIN et al. (2018).

Figura 10 - Sinergismo entre os agonistas de TLRs e os inibidores de check points imunes. (1) Inibição do bloqueio das células T, pelas células tumorais. (2) Aumento da expressão de citocinas inflamatórias pelos agonistas de TLRs, levando a aumento da infiltração de células imunes. (3) Aumento de neoantígenos, como resultado da carga mutacional tumoral. (4) Apresentação dos neoantígenos às células T, via complexo de histocompatibilidade maior (MHC), ativando os receptores de células T. (5) Células T anti-tumorais com alvo nos neoantígenos, inibindo ainda mais a progressão tumoral.

O sistema imunológico participa de forma ativa em todo o processo de carcinogênese. Assim, para vários tipos de tumores, a quantidade e a qualidade da resposta imune no interior do tumor primário parecem representar um fator preditivo independente da sobrevivência do paciente. Essa associação entre a imunidade e evolução clínica da doença sugere que o sistema imune do paciente naturalmente monta uma resposta imune anti-tumoral, na tentativa de impedir a formação e crescimento tumoral.

Quadro 3 - Estudos clínicos em andamento com a combinação de inibidores de check points e agonistas de TLR.

Identificador do trial	Fase	Inibidor de check point	Alvo imune	Agonista de TLR	Alvo TLR	Câncer
NCT03486301	1	Pembrolizumab	PD-1	BDB001	7,9	Vários tumores sólidos
NCT02668770	1	Ipilimumab	CTLA-4	MGN1703	9	Vários tumores sólidos
NCT03326752	1	Qualquer inibidor de PD-1	PD-1	DV281	9	CPNPC avançado
NCT03507699	1	Nivolumab Ipilimumab	PD-1 CTLA-4	CMP-001	9	CCR
NCT02643303	1/2	Durvalumab Tremelimumab	PD-1 CTLA-4	Poly-ICLC	3	Vários tumores sólidos
NCT02834052	1/2	Pembrolizumab	PD-1	Poly-ICLC	3	CCR
NCT02501473	1/2	Pembrolizumab	PD-1	G100	4	Linfoma
NCT02431559	1/2	Durvalumab	PD-1	VTX-2337	8	Câncer de ovário
NCT03435640	1/2	Nivolumab	PD-1	NKTR-262	7,8	Vários tumores sólidos
NCT02521870	1/2	Pembrolizumab	PD-1	SD-101	9	Melanoma
NCT03445533	3	ipilimumab	CTLA-4	IMO-2125	9	Melanoma

CPNPC: Câncer de pulmão não pequenas células; CCR: Câncer colorretal; PD-1: *Programmed cell death protein receptor*; CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*

Fonte: Adaptado de BRAUNSTEIN et al. (2018)

É evidente que a eficiência dessa resposta presumivelmente varia de paciente para paciente, desse modo, pode influenciar na sua sobrevivência de forma crítica. Diante disso, a análise do perfil de alterações na expressão de receptores Toll-like e das suas vias de sinalização intracelular em células leucocitárias no sangue e tecido tumoral tem potencial para permitir a identificação de possíveis biomarcadores envolvidos na agressividade, crescimento e metástases tumoral. Estudos em humanos têm demonstrado uma significativa associação entre a presença de alterações nos receptores do sistema imune com a resposta clínica ao tratamento em pacientes com diversos tumores sólidos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos receptores *Toll-like 2* e *9*, e das vias de sinalização intracelular NF- κ Bp65 e MAPKp38 no carcinoma escamoso de pênis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em pacientes com carcinoma escamoso de pênis:

- Descrever as frequências das características anatomopatológicas e de infecção por HPV;
- Determinar os níveis de expressão dos receptores TLR2 e TLR9 no sangue periférico e no microambiente tumoral;
- Determinar a expressão das vias de sinalização intracelular NF κ Bp65 e MAPKp38 no sangue periférico e no microambiente tumoral;
- Avaliar se existem alterações na expressão de TLR2, TLR9, NF κ Bp65 e MAPKp38 no sangue periférico dos pacientes;
- Associar os níveis de expressão de TLR2, TLR9, NF κ Bp65 e MAPKp38 com características anatomopatológicas (invasão perineural e tamanho tumoral);
- Correlacionar os níveis de expressão de TLR2, TLR9, NF κ Bp65 e MAPKp38 no sangue periférico e microambiente tumoral

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DETALHES DO ESTUDO

Foi um estudo transversal com grupo de comparação interna, realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Para realização do estudo foi obtida uma amostra não-probabilística de conveniência no período de março de 2015 a dezembro de 2017.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco sob o número CAAE 39974314.2.0000.5205 (Anexo 1), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE - Apêndice 1).

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

O grupo de estudo foi composto por 38 pacientes com idade acima de 18 anos e diagnóstico histológico de carcinoma escamosos de pênis.

O grupo controle foi composto por 15 indivíduos do sexo masculino com idade acima de 18 anos, assintomáticos e que não possuíam história pregressa ou familiar de câncer. Foram acompanhantes de pacientes e funcionários que concordaram em participar do estudo.

3.3 PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS SUJEITOS, COLETA DOS DADOS E SEGUIMENTO DOS PACIENTES

Todos os pacientes que fizeram parte deste trabalho assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido no momento do atendimento e responderam a um questionário padronizado (Apêndice 2). Sempre que necessários, foram realizadas consultas no prontuário dos dados clínicos, sendo transcritos para o questionário padrão previamente definido. Os indivíduos controles foram incluídos através de convite do pesquisador para a realização de coleta sanguínea, após leitura e assinatura do TCLE.

3.3.1 Coleta de amostra de tecido tumoral

Foram coletados três fragmentos de amostra de tecido tumoral, sendo o primeiro fragmento armazenado numa solução de formol tamponado (pH 7,4) e encaminhado para o Departamento de Patologia do HCP para o diagnóstico histológico da lesão. O diagnóstico histológico foi realizado por um patologista do laboratório de histologia e patologia cirúrgica do HCP e, posteriormente, revisado por um segundo patologista (Dr. Fernando Soares). O segundo fragmento tumoral foi armazenado em meio de cultura RPMI à fresco para a análise quantitativa do microambiente tumoral pela técnica de citometria de fluxo. A terceira parte do fragmento à fresco foi conservada num microtubo de 2 mL contendo uma solução de preservação “*All protect*” (Qiagen, USA) para extração de DNA.

3.3.2 Coleta de amostra de sangue venoso

A amostra de sangue foi coletada imediatamente após inclusão do paciente no estudo. Sempre que possível, a coleta de sangue foi realizada aproveitando-se o momento da coleta de exames solicitados pela equipe médica acompanhante, a fim de evitar repetições de punções. Um volume de 4 mL de sangue foi colhido em tubo com anticoagulante, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (BD Vacutainer®) para realização da técnica de citometria de fluxo.

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.4.1 Critérios de inclusão

- idade acima de 18 anos
- Pacientes submetidos à estadiamento por exame clínico, radiológico ou anatomopatológico;
- Pacientes submetidos a tratamento cirúrgico

3.4.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com diagnóstico de infecção por HIV, hepatites virais e HTLV;
- Pacientes submetidos previamente a quimioterapia, radioterapia e/ou ressecção cirúrgica.

3.5 DEFINIÇÃO DOS TERMOS E VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

As variáveis foram coletadas na consulta clínica ou conforme informação obtida no prontuário do paciente, incluindo exames complementares e fichas de procedimentos.

Quadro 4 - Variáveis anatomopatológicas (7º Edição)

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Número de Linfonodos	Referente à avaliação do número de linfonodos ressecados, conforme laudo histopatológico	Variável numérica discreta – calculados os extremos para a amostra e a mediana
Localização do tumor	Localização do tumor pelo cirurgião	Variável nominal policotômica 1. Glândula 2. Prepúcio 3. Corpo do pênis
Margens livres	Quando a amostra da peça tumoral apresenta as margens livres de doença tumoral	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim
Tumor (T)	TX: tumor primário não pode ser avaliado T0: Não há evidência de tumor primário Tis: tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria (carcinoma <i>in situ</i>) Ta: Carcinoma verrucoso não invasivo T1: tumor invade a lâmina própria, muscular mucosa ou submucosa T1a: O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, sem invasão linfovascular ou de alto grau T1b: O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, com invasão linfovascular ou de alto grau T2: Tumor invade o corpo esponjoso ou cavernoso T3: Tumor invade invasão de uretra T4: Tumor invade estruturas adjacentes	Variável nominal policotômica 1. Tis 2. T1 3. T2 4. T3 5. T4
Linfonodos (N)	Nx: linfonodos regionais não podem ser avaliados N0: Ausência de metástases nos linfonodos regionais N1: Metástase em um único linfonodo inguinal N2: Metástase múltiplas ou bilateral em linfonodos regionais N3: Metástases com extensão extranodal ou metástases em linfonodos pélvicos	Variável nominal policotômica 1. N0 2. N1 3. N2 4. N3

Cont/Quadro 4

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Metástase (M)	Presença de metástases à distância	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim
Estadio Anatômico	0. Tis, N0, M0. I. T1a, N0, M0. II. T1b, N2, M0; T2, N1, M0; T3, N0, M0. IIIA. T1, T2, N3, M0, N1, M0. IIIB. T1, T2, N3, M0, N2, M0. IV. Qualquer T, N3, M0; T4, qualquer N, M0; Qualquer T, qualquer N, M1.	Variável nominal policotômica 1. IS 2. I 3. II 4. IIIA 5. IIIB 6. IV
Grau da Classificação da histologia	G1 – bem diferenciado (baixo grau); G2 – moderadamente diferenciado (grau intermediário); G3- pouco diferenciado (alto grau); G4 – indiferenciado (alto grau)	Variável nominal policotômica 1. GX 2. G1 3. G2 4. G3 5. G4
Invasão angiolinfática	De acordo com a descrição microscópica foi observada invasão vascular (invasão dos vasos sanguíneos ou angiolinfática)	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim

3.6 TESTES LABORATORIAIS

3.6.1 Extração de DNA

Foi colhido material de tecido fresco dos pacientes e em seguida, o material biológico foi armazenado no biorrepositório do Laboratório de Pesquisa Translacional para posterior extração de DNA.

O DNA dos pacientes foi extraído, utilizando *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Foi retirado um fragmento de até 25 mg da amostra de tecido fresco e colocada num microtubo de 2 mL contendo 180 µL de tampão de lise (ATL). Em seguida, foram adicionados 20 µL de proteinase K, e incubado a 56°C em agitação por 3 horas no equipamento *Shaker* orbital e recíproco de bancada com controle de temperatura (Jeio Tech ®). A inativação da proteinase K

foi realizada pela manutenção das amostras a 90°C em agitação constante durante 10 minutos.

As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rotações por minuto (rpm) por 30 segundos e, em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão de AL e 200 µL de etanol absoluto. Em seguida, a solução foi transferida para uma coluna e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. Adicionou-se em seguida 500 µL de tampão de lavagem (AW1) à coluna e esta foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto. Foram adicionados em seguida 500 µL de um segundo tampão de lavagem (AW2) à coluna e esta foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto.

Foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos para a retirada de qualquer resíduo do tampão. Em seguida, foram acrescentados ao centro da coluna 100 µL de tampão de eluição (AE), deixado a temperatura ambiente por 1 minuto e o tubo foi posteriormente centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, esse material foi armazenado em freezer -20°C para posteriores análises.

3.6.2 Quantificação do DNA

A quantificação e determinação da pureza das amostras de DNA foram feitas num espectrofotômetro para determinar a concentração de ácidos nucleicos e proteínas em solução. Verificou o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a absorvância em 260 nm e a absorvância em 280 nm (comprimento de onda necessário para medir a concentração de proteínas contaminantes na solução). As amostras foram consideradas puras quando essa razão foi igual ou superior ao valor de 1,7.

3.6.3 Técnica de *polymerase chain reaction* (PCR) para detecção de HPV no tecido tumoral

O DNA extraído foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) por reação multiplex com primers PGMY09/11 (GRAVITT et al. 2000) que amplificaram de 450 pares de base de um segmento do gene L1 do HPV que codifica a proteína principal do capsídeo viral. Como controle endógeno da reação foi utilizado os primers do gene β -actina customizados (Thermofischer) para avaliar a qualidade e quantidade da amostra de DNA dos pacientes. Para cada reação foram utilizados 2 μ L do DNA extraído; 2,5 μ L de tampão 10X; 0,5 μ L de $MgCl_2$ 50 nM; 0,2 μ L de DNTP 25 mM; 1 μ L do conjunto de primers PGMY09 (200 nM) 1 μ L do conjunto de primers PGMY11 (200 nM); 0,2 μ l de DNA Polimerase Taq Platinum (5U/ μ L) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) em volume final de 25 μ L.

A reação seguiu a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial à 94°C por 2 minutos seguida de 40 ciclos de 94°C por 40 segundos, 40°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos e extensão final à 72°C por 2 minutos. Os controles positivos foram um pool de amostras positivas que amplificam as sequências do gene alvo e o controle negativo consistiu de água destilada ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Os produtos das reações de PCR foram então visualizados em gel de agarose 1,5% e revelados por GelRed (Biotium, USA) (Figura 11).

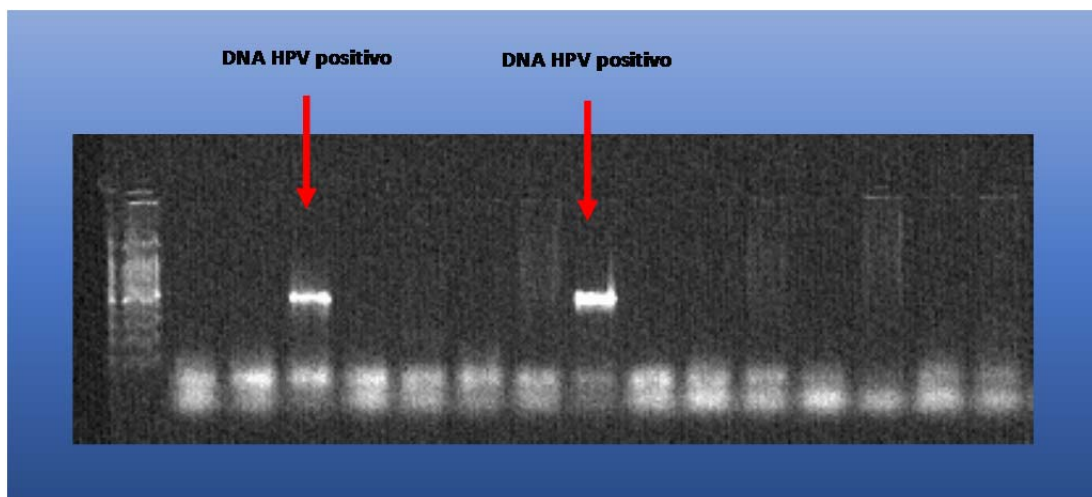


Figura 11 - Reação de PCR para detecção da infecção viral por HPV

3.6.4 Digestão enzimática do tecido tumoral

Para análise no tecido tumoral, foi realizada a digestão enzimática com o objetivo de remover o estroma e liberar as células presentes no microambiente tumoral. As amostras de tecido coletadas em meio RPMI suplementado com penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA) foram submetidas à digestão (dissociação) enzimática com collagenase I (Gibco, USA) para obtenção de suspensão celular, conforme instruções do fabricante. O tecido foi dividido em pequenos fragmentos (2 mm) com o auxílio de um bisturi estéril e imersos na solução de collagenase I, na concentração de 2 mg/mL em Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). Em seguida, foram incubados em banho seco à 37 °C por duas horas sob agitação. Após incubação, foi adicionado 2mL de Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,4) e filtrado em filtro 35 µm (BD Falcon, BD Biosciences, USA) e a suspensão celular foi centrifugada à 250 x g por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) foi lavado com PBS e centrifugado à 250 xg por 5 minutos. Em seguida, o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de PBS e 100 µL foram retirados para realizar a análise das proteínas por citometria de fluxo.

3.6.5 Técnica de citometria de fluxo

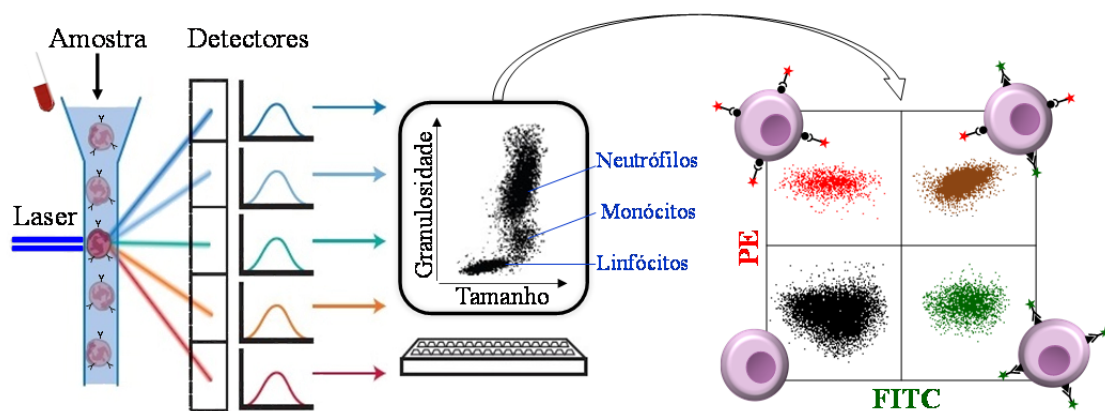
A escolha de utilizar a citometria de fluxo como técnica de análise de proteínas no tecido tumoral e no sangue periférico foi devido a essa tecnologia permitir analisar múltiplos parâmetros simultâneos de uma célula em suspensão, além de ser um método de análise quantitativo. Diferente da imunohistoquímica, que é uma técnica semi-quantitativa, e não permite analisar a expressão de várias proteínas simultaneamente, o que impossibilita a fenotipagem de populações celulares que são caracterizadas pela expressão de duas ou mais proteínas simultâneas.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma tecnologia avançada e rápida que permite contar, examinar e classificar células individuais e medir simultaneamente múltiplos parâmetros. Antes da análise, as células individuais em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos, como PE, FITC, PerCP e PE-CY-7, que diferem um do outro em relação à cor que emitem. Os anticorpos monoclonais têm especificidade para moléculas expressas na membrana e no interior das células, o que possibilita caracterizar leucócitos humanos e outras células humanas, bem como analisar suas funções. Essas moléculas são identificadas como “clusters of differentiation” (CD).

No citômetro de fluxo, o sistema de fluidos canaliza uma amostra de células em um único fluxo para que as células passem uma a uma através de um feixe focalizado de um laser. À medida que cada célula passa através do feixe, as propriedades de dispersão da luz e a fluorescência são coletados pelo sistema óptico e direcionados para vários detectores. Os sinais recebidos pelos detectores são então

convertidos em valores numéricos pelo sistema eletrônico e analisados em software específico.

Conforme uma célula passa por um feixe de laser, a luz é espalhada em direções diferentes e dois parâmetros são definidos: tamanho de célula, representado pela dispersão direta da luz do laser (Forward Scatter - FSC); e complexidade celular (granularidade), representada por dispersão lateral da luz do laser (Side Scatter - SSC). Esta informação é exibida visualmente em um gráfico de pontos (dot plot), no qual cada ponto representa uma única célula que são diferenciadas pela forma como dispersam a luz e pela fluorescência que é proporcionalmente direta à quantidade de moléculas expressas na célula. A Figura 12 apresenta uma visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.



Fonte: Bd

Figura 12 - Visão geral da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

3.6.6 Determinação quantitativa da expressão de TLR2, TLR9, MAPKp38, NFκBp65 por citometria de fluxo no sangue periférico e tecido tumoral

A primeira etapa foi marcação dos receptores de superfície celular (CD14, CD16 e TLR2): As células foram fixadas com 100 µL de BD Cytofix/Cytoperm™ pré-aquecido e incubadas por 10 minutos à 37 °C. Em seguida, após centrifugação à 250 xg por 8 minutos, foram adicionados os anticorpos monoclonais anti-CD14 (identificação de monócitos), anti-CD16 (neutrófilos), TLR 2 e TLR9.

Para marcação das proteínas intracelular TLR9, MAPKp38 e NFκBp65 foi realizada a permeabilização da membrana celular, utilizando reagentes BD™ Phosflow (BD Biosciences, USA). Após incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, as células foram permeabilizadas com 750 µL de *Perm Buffer III* (BD Biosciences, USA) à 4 °C e incubadas por 30 minutos submergidas no gelo, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 3 mL de PBS, centrifugadas à 250 xg por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram realizadas 3 lavagens com PBS. Posteriormente, foi realizada a marcação intracelular com a adição de 5 uL anticorpos monoclonais (BD, Pharmigen®, San Diego, CA) anti-phospho-p38 MAPK (T180/Y182; Clone 36/p38), anti-NF-κB p65 (pS529; Clone K10-895.12.50) e TLR9 e incubado à 4°C por 30 min e protegido da luz. Após a incubação, adicionando-se 2 mL de Perm/Wash 1x concentrado (BD, Cytofix/Cytoperm™ Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e centrifugou-se a 300 x g por 5 min a temperatura de 20 °C. Após a incubação, foi realizada aquisição de 50.000 eventos celulares no equipamento FACSVERSE® (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e as análises dos resultados foram realizadas com o programa *FACSSUITE* (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais. No sangue periférico, para calcular os valores absolutos, multiplicou-se

o valor percentual encontrado pelo o número absoluto de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos obtidos a partir da contagem diferencial dos leucócitos foi realizada no equipamento automatizado SDH-3 (Labtest). Essa contagem foi realizada na mesma amostra de sangue periférico e no mesmo dia que foi realizada a análise de CD14, CD16, TLR2, TLR9, MAPKp38 e NFkBp65 por citometria de fluxo.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.7.1 Análise de associação

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). Teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foram utilizados para comparação entre dois grupos. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

3.7.2 Análise de Correlação

Para as análises de correlação, foi utilizado o teste não paramétrico de *Spearman* (distribuição não normal). Os níveis de correlação foram classificados segundo o valor do coeficiente (r) em desprezível (entre 0,00 e 0,3), baixo (entre 0,30 e 0,50), moderado (entre 0,50 e 0,70), alto (entre 0,70 e 0,90) e muito alto (entre 0,90 e 1,00), conforme ponto de corte descrito por MUKAKA (2012). Foi considerado significativo quando se obteve um valor de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

Foram incluídos 38 pacientes com câncer de pênis com mediana de idade de 61 anos (54,0-68,2), destes 15,8% tiveram detecção de infecção por HPV. O sítio anatômico mais frequente foi a glândula do pênis (84,2%) e metade dos tumores eram de tamanho $\leq 3,5$ ou $> 3,5$ cm. Das características avaliadas, foram mais frequentes o tipo histológico usual (71%), de grau 1 (86,8%), ausência de invasão vascular (86,8,7%) e perineural (70,0%) e não metastáticos para linfonodos (86,8%). A maioria dos pacientes apresentou estágio pT2 (55,3%), seguido de pT1 (34,2%), pT3 (7,9%) e Tis (2,6%). Detalhes na Anexo 1.

Tabela 1 - Distribuição das frequências absolutas e relativas das características anatomopatológicas e parâmetros leucocitários de 38 pacientes com carcinoma escamoso de pênis, tratados no Hospital de Câncer de Pernambuco (2015-2017).

CARACTERÍSTICAS	N	%
IDADE (anos)		
Mediana (IQR)	61 (54,0-68,2)	
	N=38	%
Sítio Anatômico		
Glande	32	84,2
Superfície cutânea do prepúcio	2	5,3
Pele do corpo peniano	4	10,5
Tamanho do Tumor		
≤ 3,5 cm	19	50,0
> 3,5 cm	19	50,0
Tipo Histológico		
Usual	27	71,0
Verruciforme	3	8,0
Sem informações	8	21,0
Grau		
G1	33	86,8
G2	3	7,9
G3	2	5,3
Invasão Vascular		
Sim	3	7,9
Não	33	86,8
Sem informações	2	5,3
Invasão Perineural		
Sim	11	29,0
Não	26	70,0
Sem informações	1	1,0
Metástases linfonodais		
Sim	5	13,2
Não	33	86,8
Estadiamento		
Tis	1	2,6
pT1	13	34,2
pT2	21	55,3
pT3	3	7,9
Infecção pelo HPV		
Positivo	6	15,8
Negativo	32	84,2
Subpopulação celular	Mediana (cel/mm³)	
Leucócitos totais	8,08 (6,42 - 10,85)	
Linfócitos	1,65 (1,21 - 2,23)	
Monócitos	0,47 (0,36 - 0,72)	
Neutrófilos	5,47 (3,30 - 7,57)	

IQR: interquartil (25-75); HPV: Papilomavírus humano

4.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TLR2 E TLR9, E DE NF- κ Bp65 E MAPKp38 NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES E CONTROLES

Foi analisado a expressão de TLR2 e 9 em leucócitos totais, monócitos e neutrófilos no sangue periférico de 38 pacientes com câncer de pênis e em 15 controles. Os valores percentuais de leucócitos totais com expressão de TLR2 e MAPKp38 foram elevados nos pacientes com câncer de pênis quando comparado aos controles saudáveis ($p=0,002$ e $p<0,0001$, respectivamente). Os pacientes apresentaram níveis percentuais reduzidos de leucócitos com expressão de TLR9 e NF κ Bp65 quando comparado aos controles ($p=0,03$).

Foi observado elevados níveis de neutrófilos com expressão de NF-kBp65 e MAPKp38 nos controles quando comparado aos pacientes ($p=0,001$ e $p<0,0001$, respectivamente) e de monócitos com expressão de TLR2, TLR9 e MAPKp38 nos pacientes quando comparado aos controles ($p=0,02$, $p=0,03$ e $p=0,01$, respectivamente). Detalhes na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise dos níveis percentuais de leucócitos totais com expressão TLR 2, TLR 9, NFκBP65 e MAPKP38 no sangue periférico de pacientes e controles.

	<i>Controles</i> N= 15	<i>Pacientes</i> N= 38	<i>Valor de p</i>
LEUCOCITOS TOTAIS			
	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Mediana (IQR)</i>	
TLR2 (%)	3,9 (3,2-5,02)	5,7 (4,1-7,2)	0.002*
TLR9 (%)	7,5 (4,2-11,6)	5,6 (2,7 - 8,1)	0.03*
NFκBp65 (%)	10,4 (14,1-7,0)	7,2 (2,5-14,7)	0.03*
MAPKp38 (%)	5,0 (7,4-4,5)	12,2 (7,2-18,3)	<0.0001*
NEUTRÓFILOS			
	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Mediana (IQR)</i>	
TLR2 (%)	0,40 (0,18-0,73)	0,62 (0,30-1,0)	0.10*
TLR9 (%)	0,72 (0,51-1,21)	0,74 (0,46 - 1,79)	0.75*
NFκBp65 (%)	0,35 (0,08-0,84)	0,00 (0,00 - 0,05)	0.001*
MAPKp38 (%)	39,3 (20,2-59,4)	0,50 (0,00 - 2,0)	<0.0001*
MONÓCITOS			
	<i>Mediana (IQR)</i>	<i>Mediana (IQR)</i>	
TLR2 (%)	3,9 (3,2-5,02)	5,7 (4,1-7,2)	0.02*
TLR9 (%)	0,54 (0,14-0,97)	1,0 (0,41-2,3)	0.03*
NFκBp65 (%)	1,47 (0,37-3,74)	1,22 (0,52-5,75)	0.60*
MAPKp38 (%)	10,05 (4,4-28,8)	31,4 (11,5-45,4)	0.01*

IQR: Interquartil 25-75%. *Teste de Mann Withney; $p < 0.05$ foi considerado significativo

4.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS TLR2 E TLR9 NO SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO TUMORAL

Devido à baixa frequência no número de pacientes entre os grupos de acordo com tipo histopatológico, grau nuclear, invasão vascular e metástases, essas variáveis foram excluídas das análises. Assim, foram realizadas análises com as variáveis invasão perineural, tamanho tumoral e estadiamento. Para análise por

tamanho do tumor (TM), foi utilizado a mediana do valor do TM de 3,5cm como ponto de corte para uma melhor distribuição do número de pacientes entre os grupos.

➤ **ANÁLISES NO SANGUE PERIFÉRICO**

○ **Invasão perineural**

Foi realizada a análise da expressão de TLR2 e TLR9 comparando os grupos de pacientes que apresentou invasão perineural (IPN+) ou não (IPN-). Não houve diferença significativa nos níveis absolutos de leucócitos totais com expressão de TLR2 e TLR9 entre os grupos (Figuras 13).

O grupo de pacientes com IPN+ apresentou níveis absolutos elevados de monócitos e neutrófilos com expressão de TLR9 ($p=0.009$ e $p=0,0003$) quando comparados ao grupo IPN- (Figuras 13).

• **Tamanho tumoral $\leq 3,5\text{cm}$ e $>3,5\text{cm}$**

Verificou-se níveis absolutos elevados de leucócitos totais com expressão de TLR9 e de neutrófilos/TLR2+ no sangue de pacientes com tumores $>3,5\text{cm}$ quando comparados ao grupo com tamanho tumoral $\leq 3,5\text{ cm}$ ($p=0.01$ e $p=0.008$, respectivamente; Figura 14).

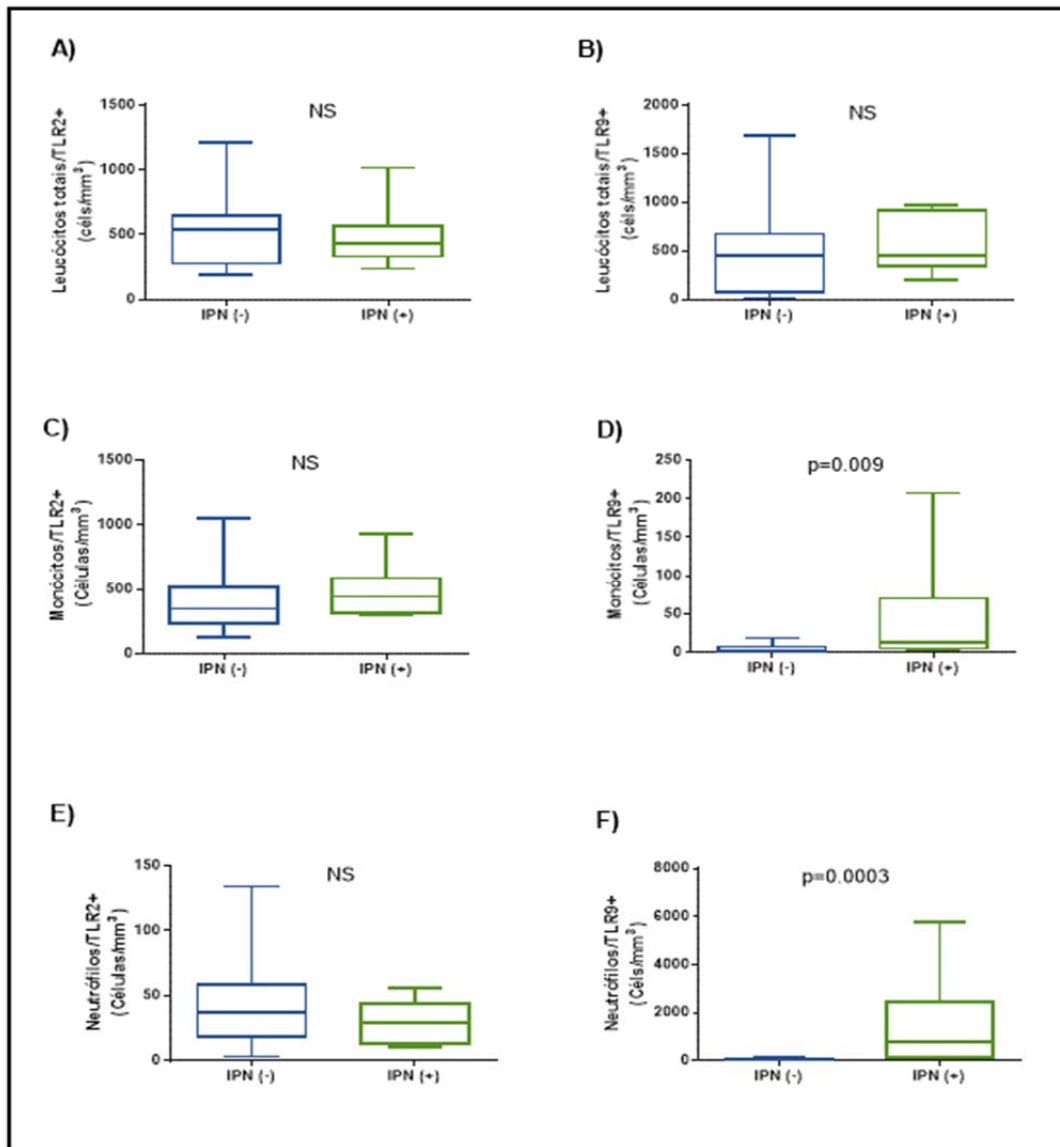


Figura 13 - Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de TLR2 e TLR9 no **sangue periférico** dos pacientes com invasão perineural (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

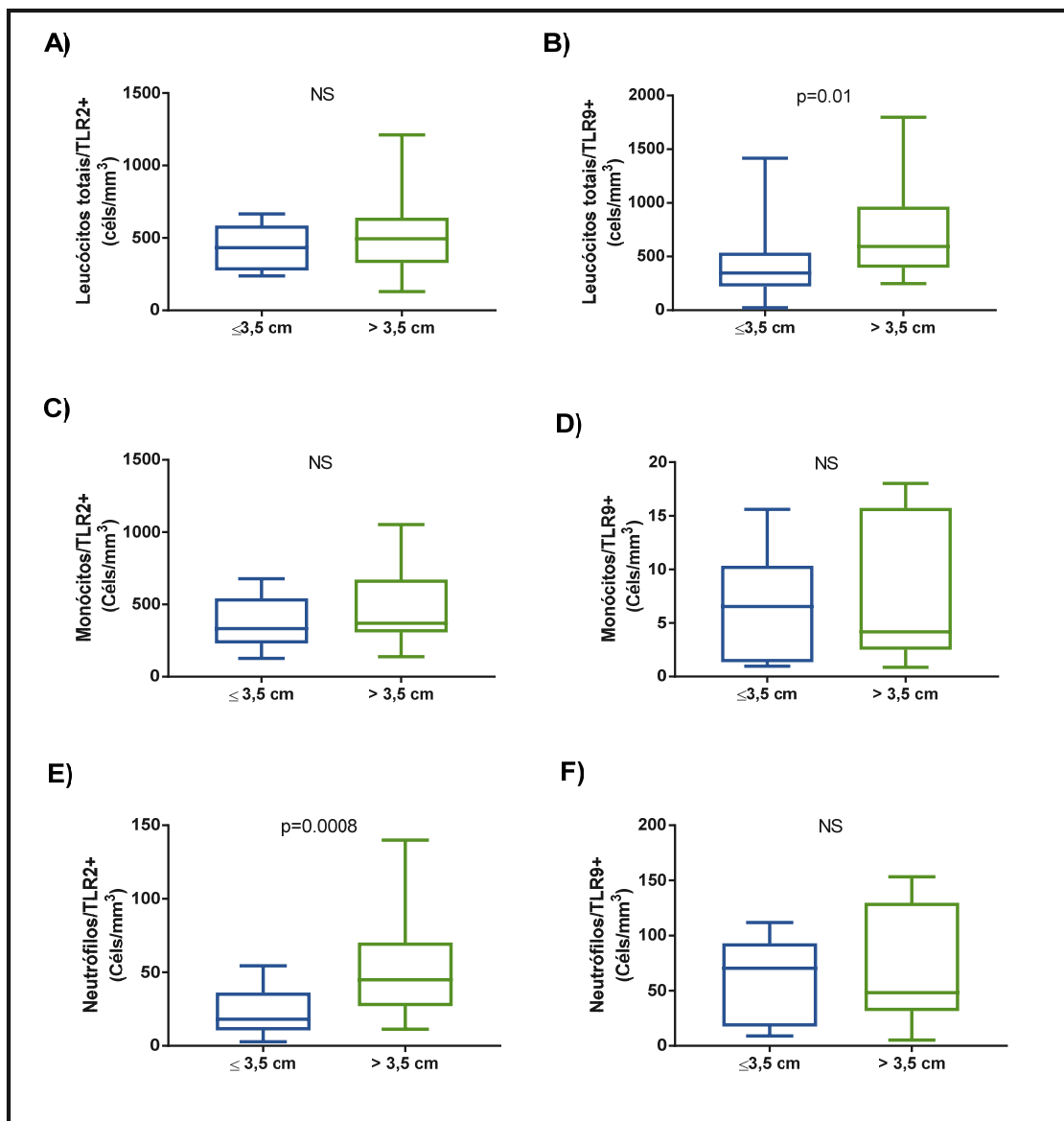


Figura 14 - Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de TLR2 e TLR9 no **sangue periférico** de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5\text{cm}$ (n=19) e $>3,5\text{cm}$ (n=19) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE NFκBp65 E MAPKp38 NO SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO TUMORAL DOS PACIENTES

➤ ANÁLISES NO SANGUE PERIFÉRICO

○ Invasão perineural

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis absolutos de leucócitos, monócitos e neutrófilos com expressão de NFκBp65 e MAPKp38 (Figura 15).

• Tamanho tumoral ≤ 3,5cm e >3,5cm

Verificou-se níveis absolutos elevados de leucócitos totais ($p=0,008$) e de neutrófilos ($p=0,01$) com expressão de NFκBp65 e níveis reduzidos de monócitos/NFκBp65+ ($p=0,02$) no sangue de pacientes com tumores $>3,5\text{cm}$ quando comparados ao grupo com tamanho tumoral $\leq 3,5\text{ cm}$ (Figura 16).

Verificou-se níveis absolutos elevados de leucócitos totais/MAPKp38+ ($p=0,03$) no sangue de pacientes com tumores $>3,5\text{cm}$ quando comparados ao grupo com tamanho tumoral $\leq 3,5\text{ cm}$ (Figura 16).

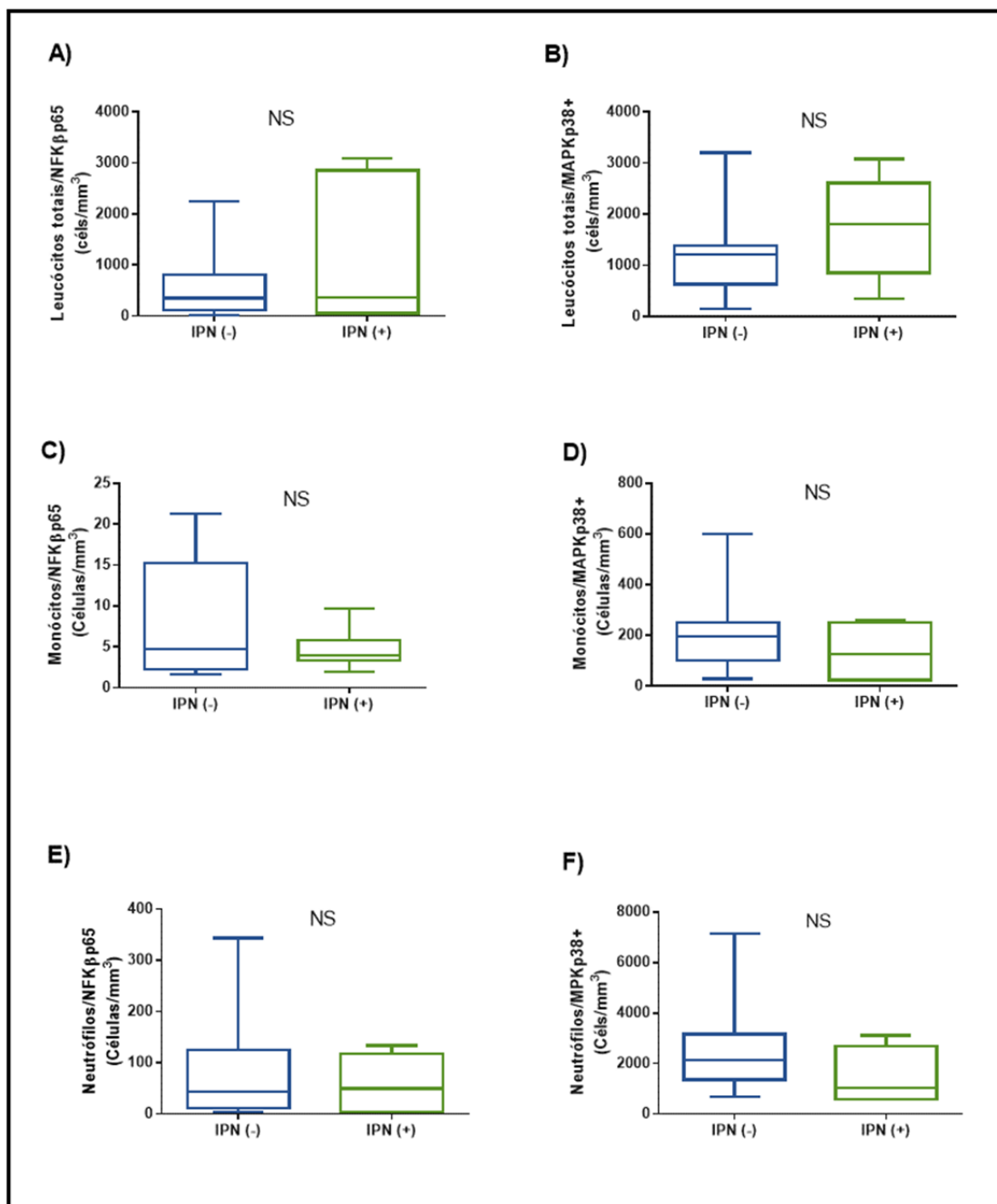


Figura 115 - Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de NF κ B p65 e MAPKp38 no sangue periférico dos pacientes com invasão perineural (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

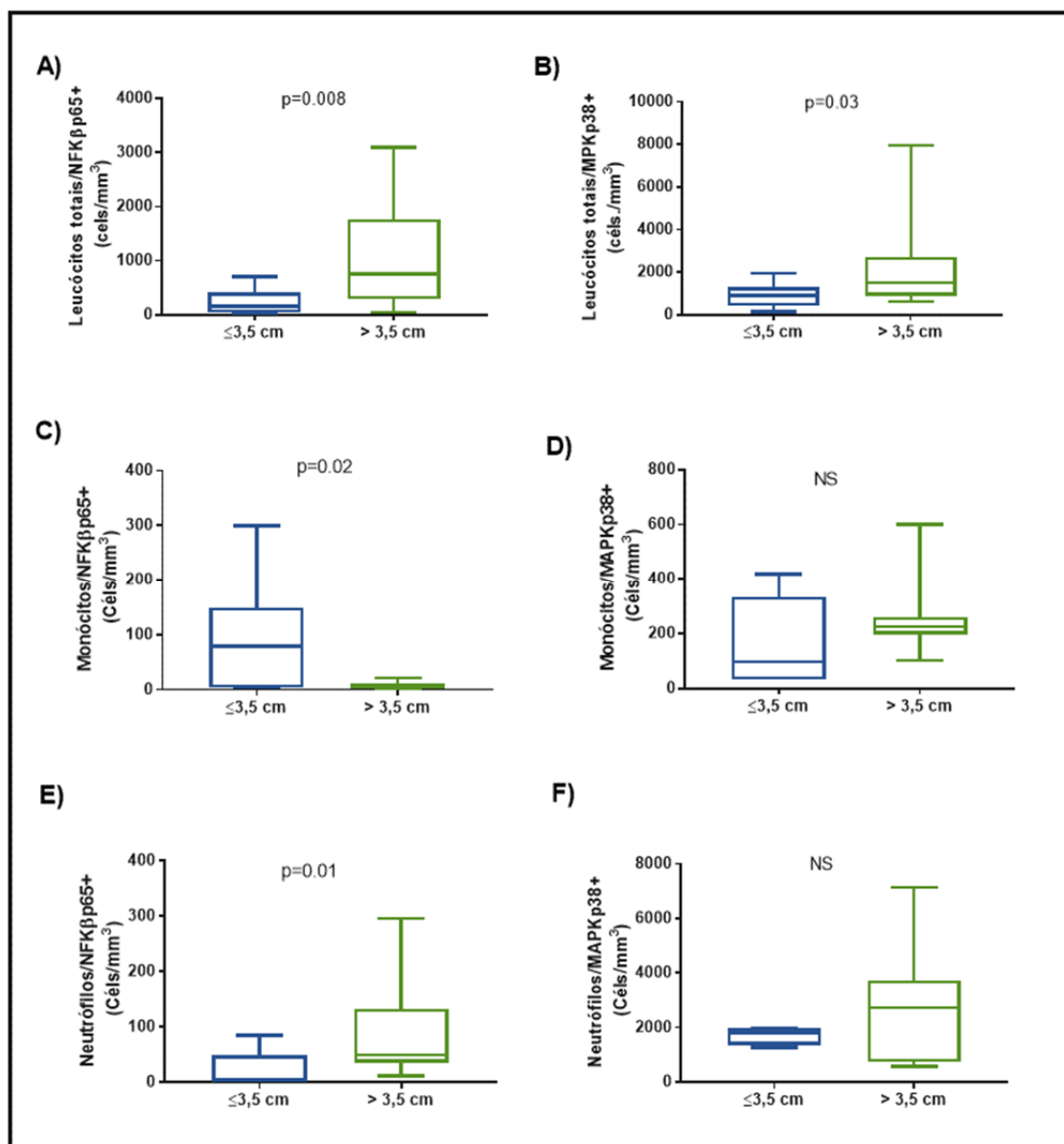


Figura 16 - Níveis absolutos de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos com expressão de NFκB p65 e MAPKp38 no **sangue periférico** de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5\text{cm}$ (n=19) e $>3,5\text{cm}$ (n=19) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

4.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS TLR2, TLR9, MAPKp38 E NFκBp65 NO TECIDO TUMORAL

Foi determinada a expressão de TLR2, TLR9, MAPKp38 e NFκBp65 no tecido tumoral fresco por citometria de fluxo de 38 pacientes com câncer de pênis. Os resultados foram expressos em mediana de intensidade de fluorescência (MFI).

- **Invasão perineural**

Não houve diferença significativa na expressão TLR2, TLR9 e NFκBp65 (MFI) no tecido tumoral entre os grupos de pacientes com presença ou ausência de invasão perineural (Figura 17). Não houve detecção de expressão MAPKp38 no tecido tumoral.

- **Tamanho tumoral ≤ 3,5cm e >3,5cm**

Verificou-se uma elevada expressão de TLR9 e NFκBp65 (MFI) nos tumores ≤ 3,5cm quando comparado aos tumores >3,5cm (p=0,02). Não houve diferença significativa na expressão de TLR2 entre os grupos de pacientes com tumores ≤3,5cm e >3,5cm (Figura 18).

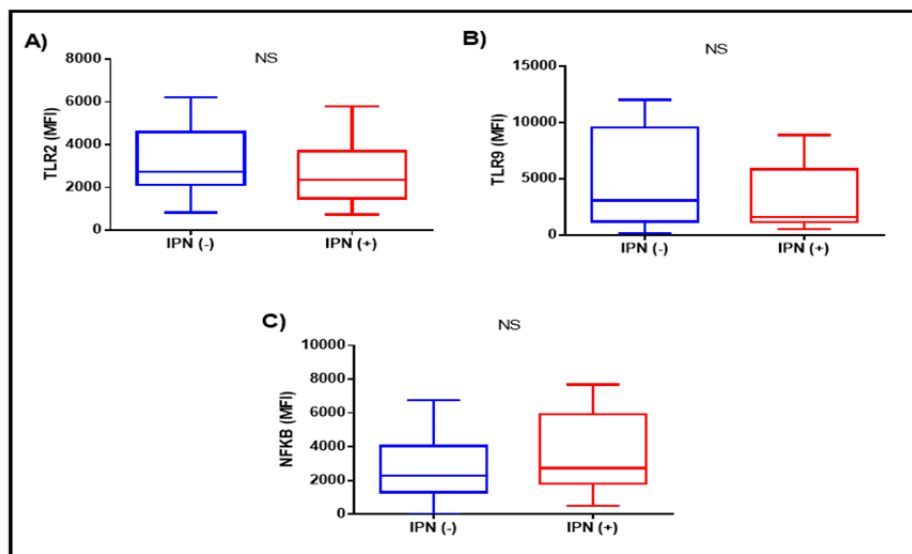


Figura 17 - Valores de mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR2, TLR9 e NFkBp65 dos pacientes com invasão perineural (IPN+; n=11) e sem invasão perineural (IPN-; n=26) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

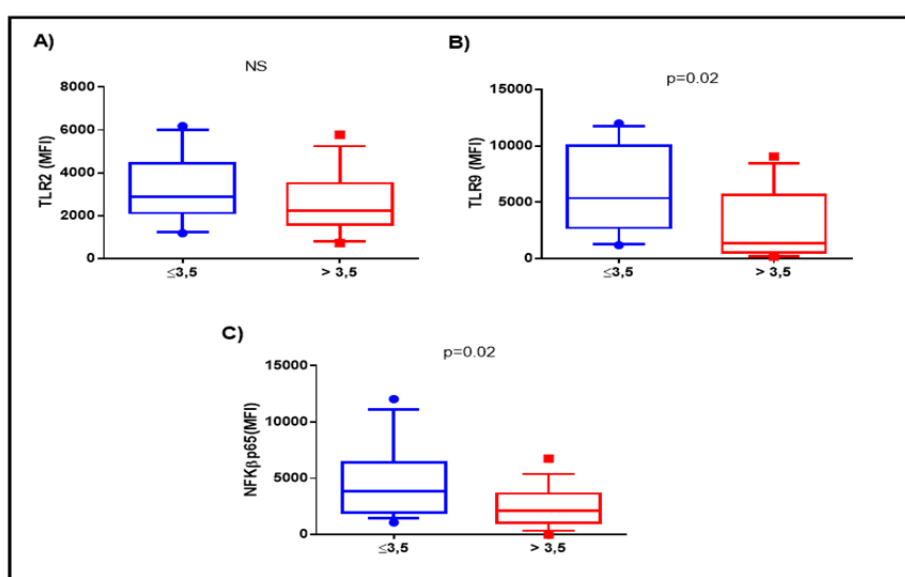


Figura 18 - Valores de mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR2, TLR9 e NFkBp65 no **tecido tumoral** de grupos de pacientes com tamanho do tumor $\leq 3,5$ cm (n=19) e $> 3,5$ cm (n=19) no carcinoma escamoso de pênis. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TLR2, TLR9 E NFκBp65 TECIDO TUMORAL

Foi realizada uma análise de correlação entre os níveis de expressão de TLR2, TLR9 e NFκBp65 no tecido tumoral. Foi observado uma moderada correlação entre a expressão de TLR2 vs TLR9 ($r=0.65$, $p=0,0009$) e TLR9 vs NF-KB ($r=0.60$; $p=0,003$), e alta correlação entre TLR2 vs NFκBp65 ($r=0.78$; $p<0,0001$). (Figura 19)

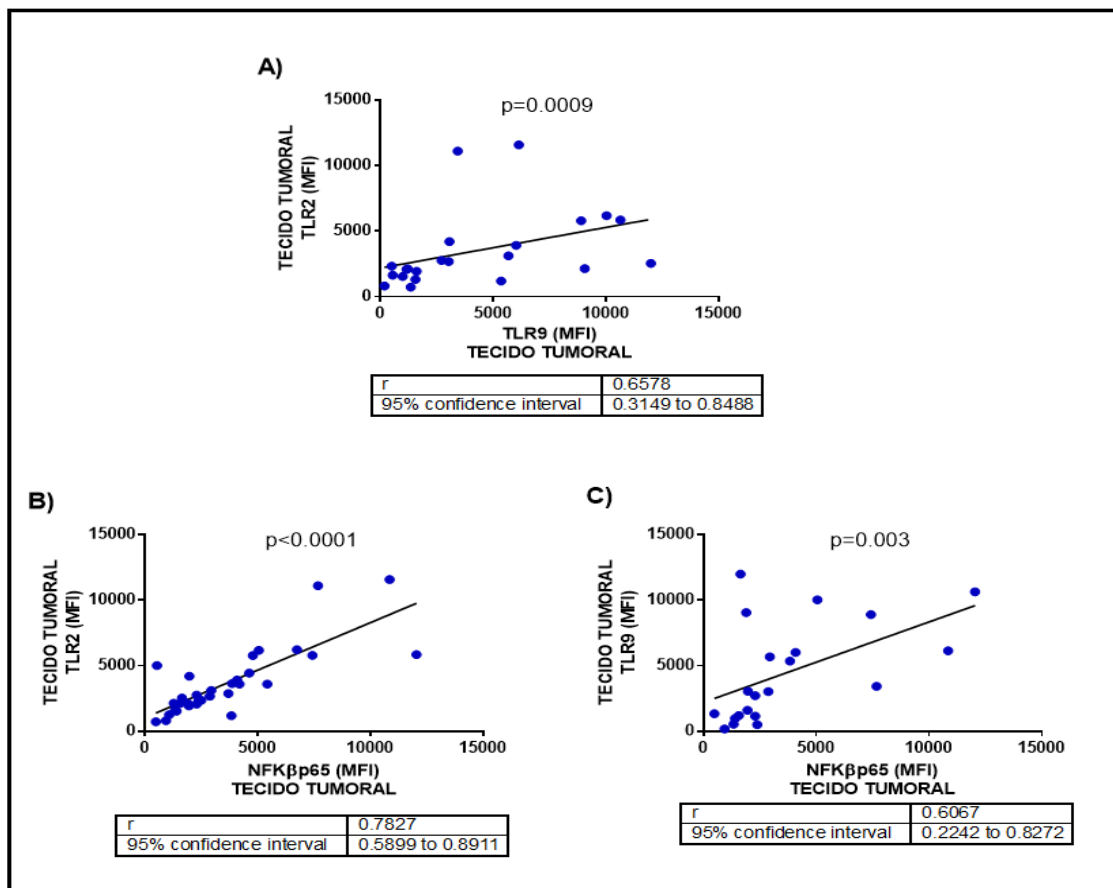


Figura 19 - Análise da correlação entre os níveis de TLR2 vs TLR9, TLR9 vs NFκBp65 TLR2 vs NFκBp65 no tecido tumoral de pênis. *Spearman correlation test*. Foi considerado significativo $p<0,05$.

4.7 CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TLR2, TLR9 E NFκBp65 ENTRE O SANGUE PERIFÉRICO E TECIDO TUMORAL

Para saber se os níveis de expressão de TLR2, TLR9 e NFκBp65 no sangue foram semelhantes aos do microambiente tumoral, foi realizado um análise de correlação. Não foi observado correlação dos níveis de TLR2, TLR9 e NFκBp65 entre sangue e tecido tumoral (Figura 20).

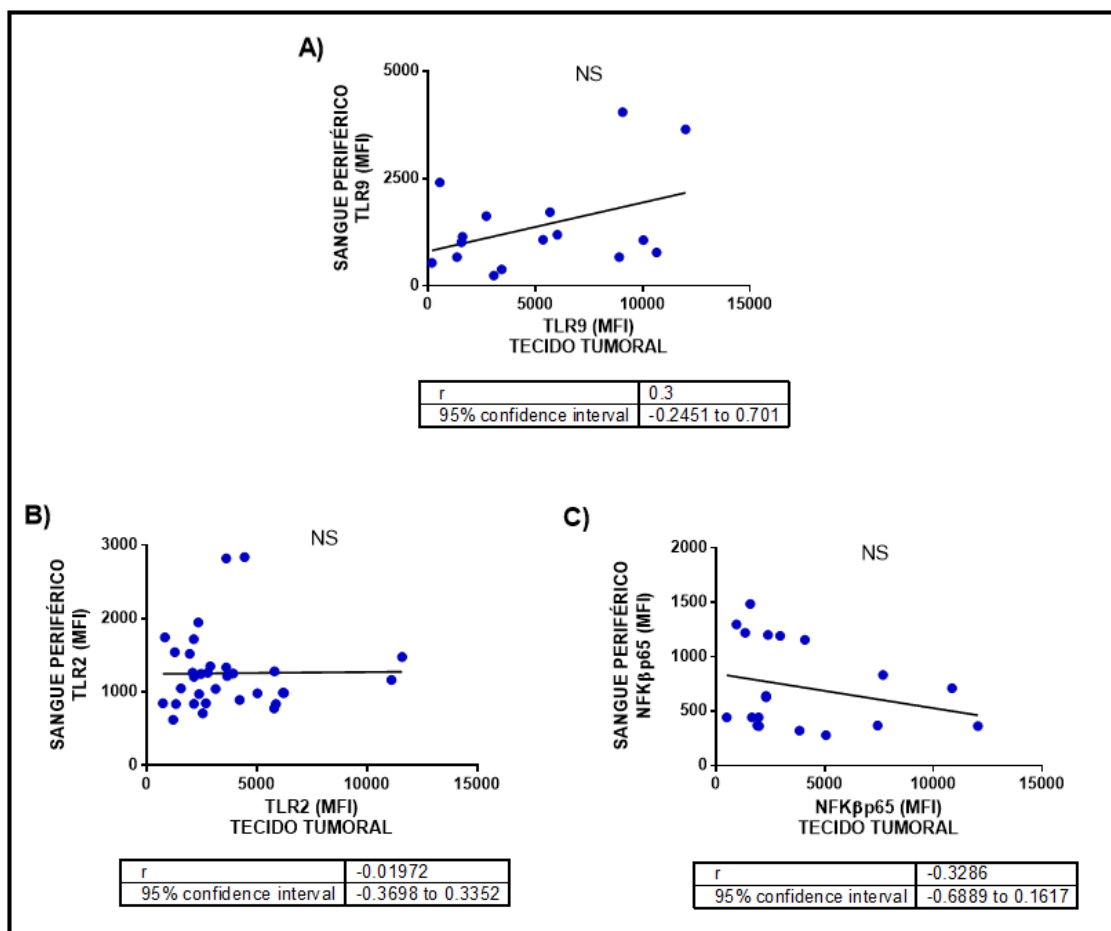


Figura 20 - Análise da correlação dos níveis TLR2, TLR9 e NF-KB no sangue e tecido tumoral de pênis. Spearman correlation test. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os estudos dos aspectos imunológicos no câncer têm sido de grande relevância para o surgimento de novas terapias nos últimos anos. O entendimento da expressão de moléculas que possuem função importante na resposta antitumoral tem gerado grande interesse científico.

Do ponto de vista epidemiológico, nossos dados foram semelhantes aos da literatura. A idade mediana de nossos pacientes foi de 61 anos, localizados na região da glândula e do subtipo histológico usual, corroborando com os dados já publicados. Os dados de metástases linfonodais mostrou-se menos frequente do que a literatura cita (Em torno de 54%). Apesar de ser um tumor muitas vezes visível e/ou sintomático, muitos apresentaram-se com tumores grandes (50% tinham tumores acima de 3,5 cm) e que infiltravam até corpo cavernoso e esponjoso, também concordando com dados publicados recentemente em 392 pacientes com câncer de pênis no Maranhão (GUIMARÃES 2009; COELHO et al. 2018).

A incidência de HPV no pacientes com câncer de pênis foi inferior aos dados da literatura. Nossa casuística apresentou a incidência de 15,8%. Alguns autores questionam a técnica utilizada para detecção de HPV como fator determinante nas diferentes incidências encontradas no Brasil e no mundo. Na maior casuística publicada, ALEMANY et al. (2016) identificaram uma incidência de 33,1% de HPV em pacientes com câncer de pênis, numa análise com amostra de tecido tumoral varias regiões do mundo. Ao analisar a incidência por continente, esta variou de 18,8% na América do Norte a 55,6%, na Oceânia. O número de amostras em cada

continente também variou bastante, sendo 89% dos indivíduos da Europa e América Latina. Talvez o maior fator impactante de variação da incidência da infecção pelo HPV seja o pequeno número de amostras. Uma estimativa real, com métodos de detecção uniformizados são necessários para termos a real taxa de incidência. É importante levarmos em conta que a incidência em cada região de um país continental como o Brasil pode ser diferente, por suas grandes divergências culturais e de grau de instrução.

Neste trabalho, observou-se alterações na expressão de TLR2, TLR9, NF κ Bp65 e MAPKp38 nos pacientes com câncer de pênis. Os receptores Toll-like têm sua maior concentração em células do sistema imune, porém também podem ser encontradas em células tumorais. O TLR2 mostrou-se mais expresso em células de carcinoma escamoso de orofaringe, quando comparado ao tecido normal (NG et al. 2011). Em nossa análise, houve uma maior expressão de TLR2 nos pacientes, sugerindo uma associação desse receptor com o processo de carcinogênese no carcinoma de pênis e pode ser devido a maior ativação de células imunes associados a tumor que atuam como pró-tumorais (PANDEY et al. 2015).

Os receptores TLRs são um conjunto de proteínas ligadas a imunidade com uma associação já conhecida nas fases de evolução de algumas neoplasias. Esses estão ligados a várias fases de progressão tumoral, como invasão tecidual e metástase, evasão imune e angiogênese (PANDEY et al. 2015). A estimulação de alguns tipos de TLRs por seus ligantes podem promover alterações celulares, como induzir a célula a entrar em fase de transição epitélio-mesênquima, fazendo com que essas assumam fenótipos invasivos (SANDHOLM et al. 2012).

A resistência tumoral ao sistema imune também pode estar relacionada a

ativação de TLRs. A estimulação dos receptores TLRs em células tumorais pode inibir a proliferação de células T e a ação das células *Natural Killer* (NK), enquanto o bloqueio desses receptores restaura a resposta imune celular (YU et al. 2013).

Verificou-se elevados níveis de expressão de TLR9 nos leucócitos totais e neutrófilos no sangue periférico dos pacientes. Por sua vez, LEE et al. (2007) identificaram uma maior expressão de TLR9 no tecido tumoral no carcinoma escamoso de colo uterino quando comparado ao tecido normal adjacente. Além disso, mostrou que houve uma associação entre o aumento da expressão de TLR9 com a evolução da doença, quando compararam os níveis de TLR9 entre as pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical e câncer invasivo, sendo mais expresso nos tumores mais avançados. Não se tem uma explicação para a maior expressão em tumores invasivos e como isso pode estar associado a carcinogênese.

GHOSH et al. (2015) também evidenciou aumento da expressão por imunohistoquímica de TLR2 e TLR9 em tumores de colo uterino. Em outros tumores sólidos, como em tumores gástricos, não foram observadas alterações na expressão desses receptores (SCHMAUSSER et al. 2005). Isso sugere que ainda faltam estudos que possam explicar a importância dos TLRs na carcinogênese.

Ao avaliar as subpopulações de leucócitos, houve um maior número de neutrófilos com expressão de NF κ Bp65 e MAPKp38 quando comparados aos controles saudáveis. Em cada população celular foi encontrada variação na expressão de TLRs e dos fatores de transcrição estudados, isso deve-se ao fato de que cada tipo celular apresenta mecanismos de resposta imune diferentes e o tipo de antígenos tumorais podem influenciar os níveis de expressão de vários receptores e fatores de transcrição envolvidos na resposta imune inata (LEWIS e POLLARD 2006;

TRELLAKIS et al. 2011). Os neutrófilos têm um tempo de meia vida, após migrar para o tecido, de 24-48 horas (OBEID e HANNUN 1999), devido ao aumento de expressão de fatores de transcrição que inibem os mecanismos de apoptose, como fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (METCALF 1999). Entendendo que existem diversos fatores que podem levar a um processo inflamatório crônico nos pacientes com câncer de pênis, principalmente aqueles infecciosos, a presença de microorganismos no local da lesão pode estar associado ao aumento de expressão de MAPKp38 e com isso, liberação de mediadores que promovem a migração de neutrófilos para o infiltrado tumoral (PRAMANIK et al. 2003).

A ativação da via de sinalização das MAPKp38 está associada a redução na diferenciação celular, devido ao aumento de apoptose celular (LOESCH e CHEN 2008). De um modo geral, a ativação da MAPKp38 inibe a proliferação celular, como já demonstrado em células hepáticas e cardiomiócitos fetais (AWAD et al. 2000; ENGEL et al. 2005). Adicionalmente, a ativação desse fator pode ter uma influência positiva na diferenciação celular, também observada em células tumorais (PURI et al. 2000; WU et al. 2000).

A elevada expressão de NFκBp65 nos leucócitos totais e neutrófilos no sangue encontrada no grupo de pacientes com tumores acima de 3,5 cm, mostra o envolvimento dessa via de sinalização na progressão da doença no câncer de pênis. Estudos em tumores de colo uterino mostram que o NFκBp65 tem um papel importante na progressão do câncer, já que houve uma maior expressão em lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau e carcinoma invasivo quando comparados a sua expressão em tecidos normais (DAC et al. 2016). PRUSTY et al. (2005) também relataram o aumento da expressão de NFκBp65 no carcinoma invasivo no câncer de

colo uterino, principalmente por homodímeros de p50.

Os neutrófilos associados aos tumores (TAN) tem um papel relevante em vários tipos de tumores e já foi descrito como um indicador de pior prognóstico, quando encontrado no infiltrado tumoral (TRELLAKIS et al. 2011). Em carcinoma escamoso de língua, o acometimento linfonodal, estádios clínicos mais avançados e maior chance de recorrência, foram relacionados ao infiltrado de TANs (WANG N et al. 2014). A discussão de como o grau de expressão desses receptores também pode sugerir dados relevantes, principalmente na avaliação de fatores de risco de recorrência ou prognóstica.

Em carcinoma de cabeça e pescoço, as células tumorais estimulam a motilidade de neutrófilos, além de aumentar a sua sobrevivência e podendo agir em sinergia, aumentando a atividade inflamatória dos neutrófilos. Algumas quimiocinas como a CCL4 e matriz de metaloproteinase 9 têm um papel fundamental nesse processo (TRELLAKIS et al. 2011). Esse sinergismo entre neutrófilos e células tumorais pode acarretar um aumento de invasibilidade tumoral, além de potencializar atividades migratórias das mesmas (DUMITRU et al. 2011; GLOGAUER et al. 2015). Em carcinomas escamosos orais, o infiltrado intra-tumoral de TAN foi encontrado em pacientes com tumores T4, ou seja, mais avançado, com metástases linfonodais, além de apresentarem menor sobrevivência quando altamente expressores de marcadores para neutrófilos (LU et al. 2017), sugerindo que realmente os neutrófilos tem um papel importante na progressão no carcinoma oral.

Em relação aos monócitos, havia uma menor quantidade dessas células com expressão de TLR9 e MAPKp38 no sangue. Os monócitos são células que vão dar origem aos macrófagos nos tecidos e estão relacionadas ao sistema imune inato. Os

macrófagos teciduais tem como principal função a fagocitose de microorganismos, de restos celulares e partículas alheias, além de apresentarem antígenos aos linfócitos T. No contexto de macrófagos associados a tumor (TAM), várias das características desse subtipo celular são perdidas, por influência do microambiente tumoral, podendo inclusive influenciar no prognóstico e progressão tumoral (LEWIS e POLLARD 2006). Estas expressam de forma constitutiva CD14 e dependendo do subtipo presente no microambiente tumoral, eles podem suprimir ou ativar a resposta imune anti-tumoral.

A presença de macrófagos associados ao tumor pode estar relacionada a um pior prognóstico em carcinoma de células escamosas de orofaringe e cavidade oral (SUN et al. 2016). SUN et al. (2016) identificaram um maior número de macrófagos no microambiente tumoral, sendo um fator prognóstico em pacientes com carcinomas escamosos de laringe, pois havia uma relação direta com a metástase linfonodal, além de uma menor sobrevida livre de doença em 5 anos. KIM et al. (2013) identificaram tumores de maior dimensão nos carcinomas papilíferos de tireóide que apresentavam maior densidade de macrófagos.

Ao contrário do que foi observado no sangue, os pacientes com câncer de pênis apresentaram reduzida MFI de NF κ Bp65 nos tumores acima de 3,5 cm. A redução da expressão do NF κ Bp65 pode ser devido ao processo inflamatório crônico presente nos tumores avançados, onde a ativação dessa via de forma contínua está associada desregulação da resposta imune e evasão tumoral, já que essa via de sinalização é fundamental para produção de mediadores inflamatórios importantes para a eficácia da resposta imune anti-tumoral (LAWRENCE 2009). Há a possibilidade de haver redução da expressão, pelo processo de carcinogênese,

reduzindo sua expressão em leucócitos circulantes, impedindo assim a sua atuação contra as células tumorais. O processo de angiogênese também pode ser acelerado pela estimulação dos TLRs. A cascata de sinalização com produção de fator de transcrição NFκB está ligado ao aumento dos níveis de IL-1β que induzem a fatores angiogênicos como o VEGF e a IL-8, relacionados ao crescimento tumoral (SAIJO et al. 2002).

A expressão dos TLRs pode ser variável, de acordo com o tecido estudado e entre indivíduos. Em um estudo com carcinoma de células escamosas de língua, foi evidenciado expressão de TLR2, 4, 5, 7 e 9 em todos os materiais estudados. Da mesma forma, havia expressão desses receptores nos tecidos não neoplásicos da língua, sendo a grande diferença relacionado ao padrão e o grau de expressão desses TLRs. Para o TLR2 e 4, a expressão foi visualizada nos tecidos neoplásicos e não neoplásicos, porém a expressão no carcinoma foi mais forte. Na expressão do TLR9, foi observado expressão leve a moderada em praticamente todos os tecidos tumorais, assim como nos tecidos não neoplásicos (MÄKINEN et al. 2015).

A expressão desses receptores foi associada com alguns aspectos clínicos de relevância. Por exemplo, a expressão do TLR2 e 4 foi associada a maior invasão tumoral e maior grau de diferenciação nos carcinomas escamosos de cabeça e pescoço. Apesar desses autores não observarem diferença na expressão de TLR2 e 4 associada ao tamanho do tumor, houve uma aumento da expressão desses TLRs nos pacientes com maior invasão tumoral e grau de diferenciação, sugerindo que esses receptores podem estar associados a uma maior agressividade tumoral. Da mesma forma, a maior expressão de TLR9, foi mais comum entre os pacientes que apresentavam maiores tumores e maior invasão tumoral (MÄKINEN et al. 2015).

Em carcinoma de Merkel, a expressão citoplasmática de TLR2 em células tumorais, por imunohistoquímica, foi associado a tumores pequenos. Porém quando avaliado em expressão nuclear, essa relação se torna diferente e mais correlacionada com tumores maiores (JOUHI et al. 2015).

Nos pacientes com carcinomas de pâncreas, a elevada expressão de TLR2 em células tumorais foi associada a melhor sobrevida em 12 meses em pacientes com tumor menor que 3 cm, como também a elevada expressão de TLR4 no tecido tumoral no grupo de pacientes sem comprometimento linfonodal foi observada uma melhor taxa de sobrevida em 12 meses (LANKI et al. 2018).

Em carcinomas escamosos orais, células tumorais com uma maior expressão de TLR9 foram encontradas em tumores maiores e com estadiamento mais avançado. Além disso, foi demonstrado que tumores com alto índice proliferativo apresentaram maior percentual de células com expressão de TLR9 (RUAN et al. 2011).

Contudo, ao contrário do que foi observado no sangue dos pacientes, a expressão de TLR9 e NFκBp65 foi reduzida no tecido tumoral dos pacientes com tumores maiores que 3,5 cm. Esta diferença pode estar relacionada à carcinogênese e dinâmica do sistema imunológico tumoral, fazendo com que sua análise possa ser feita tanto em tecido tumoral, quanto em sangue periférico. Deve-se entender que essas alterações não necessariamente são as mesmas, entretanto uma interação indireta pode existir e precisa ser melhor entendida.

É de extremo valor o entendimento de fatores prognósticos, principalmente quando conseguimos avaliá-los por biomarcadores. O TLRs e seus fatores de transcrição, como o NFκBp65 e MAPKp38 certamente são exemplos que devem ser levados em consideração, já que apresentam uma relação com características

tumorais que repercutem maior agressividade, como o tamanho e a invasão perineural. A análise de leucócitos totais séricos demonstrou diferenças entre as expressões de alguns desses marcadores, porém a análise de quais subtipos celulares que os expressam pode também ter uma relação direta com fatores de pior prognóstico.

De forma similar às células tumorais, o infiltrado celular do sistema imune no microambiente tumoral exerce uma influência importante para a dinâmica tumoral. Esse microambiente possui uma mistura de células como os fibroblastos associados ao tumor, células de músculo liso, células endoteliais, neutrófilos, linfócitos e macrófagos. Tanto os fibroblastos como os macrófagos podem estar relacionados a progressão de alguns tipos tumorais, como o de língua (SUN et al. 2016).

Notamos que, ao analisar a correlação entre os diversos TLRs entre si e com o NFκBp65, podemos evidenciar que claramente há uma correlação positiva entre a expressão de TLR2, TLR9 e a via NFκBp65 no tecido tumoral, mostrando que existe interação entre esses receptores TLRs e essa via de sinalização no microambiente tumoral. Os resultados obtidos com este estudo mostram que é possível encontrar alterações de mecanismo da resposta imune inata a nível sistêmico, trazendo a tona potenciais biomarcadores no sangue de pacientes com câncer de pênis, já que foi demonstrado a associação dos níveis de TLR2, TLR9, MAPKp38 e NFκBp65 com a progressão da doença, inclusive podendo prever prognóstico, chance de recorrência, mortalidade e sensibilidade ao tratamento quimioterápico ou radioterápico.

Os dados apresentados mostram que há uma heterogeneidade na expressão de diversos fatores ligados a atividade imunológica tumoral. Há também fatores que

podem mudar sua expressão e que podem influenciar no entendimento das consequências dos tumores na estabilidade celular dos indivíduos. A compreensão de todas essas variáveis pode trazer informações relevantes para a avaliação inicial, bem como acompanhamento e tratamento dos pacientes, contribuindo para um melhor entendimento do prognóstico e chance de recorrência dos pacientes com tumores de pênis.

Todo o racional centrado nas combinações de tratamento imunoterápicos traz consigo uma possibilidade imensa de benefícios presumidos. O investimento por trazer desse conceito com uma estratégia (Agonistas de TLR associado a inibidores de *checkpoints* imunológicos) já está sendo estudado e mostrando que essas proteínas podem ser o próximo grande avanço do tratamento oncológico. Ainda outros alvos promissores, como os mediadores de sinalização dos TLRs, vêm sendo estudados. O MYD88 parece ser o mais promissor desses fatores, já com dados interessantes e com uma relação direta, principalmente por fazer a ligação entre TLRs e núcleos, tanto de superfície celular, como dos endossomos (BRAUNSTEIN et al. 2018).

Na análise dos dados, detectamos limitações, principalmente o pequeno número de pacientes e a não padronização da forma de avaliação desses receptores e de como interpretá-los. A comparação e o entendimento ainda são obstáculos no entendimento da real importância e de seu papel na doença, de forma geral. Muito se tem a evoluir, pois a falta de dados ou até a heterogeneidade dos já existentes, não permitem ainda uma conclusão mais objetiva. É uma questão de tempo até termos respostas a todas as perguntas existentes e questionamentos propostos.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir:

- Houve diferença na expressão dos receptores de Toll-like 2 e 9 e nos fatores de transcrição NFκBp65 e MAPKp38, no carcinoma escamoso de pênis;
- As características anatomopatológicas foram semelhantes às encontradas na literatura, porém a frequência de infecção por HPV foi baixa;
- Mostramos diferenças nos níveis de expressão dos receptores TLR2 e TLR9, NFκBp65 e MAPKp38 entre os pacientes e controles, no sangue periférico
- Mostramos diferenças nos níveis de expressão de TLR2, TLR9, NFκBp65 e MAPKp38 de acordo com os parâmetros anatomopatológicos invasão perineural e tamanho tumoral;
- Mostramos há correlação positiva dos níveis de expressão de TLR2, TLR9, NFκBp65 no tecido tumoral, porém não havia correlação dos níveis de expressão de proteínas entre o tecido tumoral e sangue periférico. Além disso, a expressão da MAPKp38 no tecido tumoral foi indetectável.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi observada uma baixa frequência de infecção por HPV, conforme descrito na literatura.
- Foi possível determinar a expressão das proteínas TLR2, TLR9, NFκBp65 e MAPKp38 no sangue periférico de pacientes e controles, isso sugere que existe uma expressão basal dessas proteínas no sangue, o que viabiliza a identificação de valores de normalidade;
- A falta de expressão de MAPKp38 no tecido tumoral sugere que outras isoformas dessa via precisam ser estudadas no câncer de pênis e/ou não há ativação das vias MAPK cinases no câncer de pênis;
- Existem alterações na expressão TLR2, TLR9, NFκBp65 e MAPKp38 no sangue periférico, porém o nível de expressão diferiu entre os tipos celulares, o que sugere que cada tipo celular apresenta mecanismos específicos de resposta imune;
- Foram encontradas associação dos níveis de expressão de TLR2, TLR9, NFκBp65 e MAPKp38 nos neutrófilos e monócitos com doença avançada, o que sugere que essas proteínas podem ser possíveis biomarcadores de prognóstico no câncer de pênis e potenciais alvos terapêuticos;
- Os níveis de expressão de TLR2, TLR9, NFκBp65 e MAPKp38 em neutrófilos e monócitos podem estar associados aos mecanismos pró-tumorais, pois essas células produzem fatores pró-angiogênicos, o que favorece o crescimento tumoral;

- Os níveis de expressão TLR2, TLR9, NFκBp65 e MAPKp38 no sangue e tecido tumoral não são proporcionais no câncer de pênis, o que sugere que não é possível relacionar alterações da expressão dessas proteínas entre sangue e tecido;
- Existem uma correlação na expressão de TLR2, TLR9 e NFκBp65, o que confirma que estimulação desses TLRs levam ativação da via de sinalização NFκBp65, como descrito na literatura, inclusive no câncer de pênis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. **Immunotherapy** 2009; 1:949–64.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell** 2006; 124:783-801.

Alemanly L, Cubilla A, Halec G, Kasamatsu E. Role of human papillomavirus in penile carcinomas worldwide. **Eur Urol** 2016; 69:953-61.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double- stranded RNA and activation of NF-kappa B by toll-like receptor3. **Nature** 2001; 413:732-8.

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. **Science** 1999; 285:736-9.

Anic GM, Giuliano AR. Genital HPV infection and related lesions in men. **Prev Med** 2011; 53(suppl 1):S36-S41.

Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nat Rev Immunol** 2013; 13:679-92.

Awad MM, Enslin H, Boylan JM, Davis RJ, Gruppuso PA. Growth regulation via p38 mitogen-activated protein kinase in developing liver. **J Biol Chem** 2000; 275:38716-21.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet** 2001; 357:539-45.

Basith S, Manavalan B, Yoo TH, Kim SG, Choi S. Roles of Toll- like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. **Arch Pharm Res** 2012; 35:1297-316.

Belova GI, Demidov ON, Fornace AJ Jr, Bulavin DV. Chemical inhibition of Wip1 phosphatase contributes to suppression of tumorigenesis. **Cancer Biol Ther** 2005; 4:1154-8.

Boldogh I, Albrecht T, Porter DD. Persistent viral infections. In: Baron S, editor. **Medical microbiology**. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Cap. 46.

Braunstein MJ, Kucharczyk J, Adams S. Targeting toll-like receptors for cancer therapy. **Target Oncol** 2018; 13:583-98.

Brumini R, Torloni H, Henson DE, Gotlieb SLD, De Souza JMP. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-1980**. Rio de Janeiro. Ministério da Saúde: 1982.

Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. **Nat Genet** 2002; 31:210-5.

Bulavin DV, Fornace AJ, Jr. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. **Adv Cancer Res** 2004; 92:95-118.

Bulavin DV, Phillips C, Nannenga B, et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. **Nat Genet** 2004; 36:343-50.

Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer: clinical presentation, diagnosis, and staging. **Urol Clin North Am** 1992; 19:247-56.

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res** 1970; 13:1-27

Cates W Jr. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. **Sex Transm Dis** 1999; 26:S2-S7.

Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. **Oncogene** 2011; 30:1615-30.

Chaux A, Tamboli P, Ayala A, et al. Warty-basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm. Report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010; 23:896-904.

Chaux A, Velazquez EF, Barreto JE, Ayala E, Cubilla AL. New pathologic entities in penile carcinomas: an update of the 2004 World Health Organization classification. **Semin Diagn Pathol** 2012; 29:59-66.

Chen L, Mayer JA, Krisko TI, et al. Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. **Cancer Res** 2009; 69:8853-61.

Chiang CL, Kandalaft LE, Coukos G. Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines. **Int Rev Immunol** 2011; 30:150-82.

Clark PE, Spiess PE, Agarwal N, et al. Penile cancer: clinical practice guidelines in oncology. **J Natl Compr Cancer Netw** 2013; 11:594-615.

Coblentz TR, Theodorescu D. Morbidity of modified prophylactic inguinal lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2002; 168:1386-9.

Coelho RWP, Pinho JD, Moreno JS, et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urol** 2018; 18:50.

Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1773:1358-75.

Cunha IW, Guimaraes GC, Soares F, et al. Pseudoglandular (adenoid, acantholytic) penile squamous cell carcinoma: a clinicopathologic and outcome study of 7 patients. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:551-5.

Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W. HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. **PLoS Med** 2009; 6:e10.

Dac RM, Bastos MM, Medeiros R, Oliveira PA. The NFkappaB signaling pathway in papillomavirus-induced lesions: friend or foe? **Anticancer Res** 2016; 36:2073-83.

De Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. **Crit Rev Oncol Hematol** 2009; 70:183-94.

Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2000; (205):189-93.

Djajadiningrat RS, Jordanova ES, Kroon BK. Human Papillomavirus Prevalence in Invasive Penile Cancer and Association with Clinical Outcome. **J Urol** 2015; 193:526-31.

do Couto TC, Barbosa Arruda RM, do Couto MC, Barros FD. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **Int Braz J Urol** 2014; 40:738-44.

Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cancer Cell** 2007; 11:191-205.

Dreissigacker U, Mueller MS, Unger M, et al. Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. **Cell Signal** 2006; 18:1156-68.

Drobits B, Holcman M, Amberg N, et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. **J Clin Invest** 2012; 122:575-85.

Dumitru CA, Gholaman H, Trellakis S. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation. **Int J Cancer** 2011; 129:859-69.

Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, et al. Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. **J Infect Dis** 2006; 194:1044-57.

Ellinger-Ziegelbauer H, Kelley K, Siebenlist U. Cell cycle arrest and reversion of ras-induced transformation by a conditionally activated form of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3. **Mol Cell Biol.** 1999; 19:3857-68.

Emens LA, Reilly RT, Jaffee EM. Augmenting the potency of breast cancer vaccines: combined modality immunotherapy. **Breast Dis** 2004; 20:13-24.

Engel FB, Schebesta M, Duong MT, et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. **Genes & Dev** 2005; 19:1175-87.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-93.

Ficarra V, Akduman B, Bouchot O, Palou J, Tobias-Machado M. Prognostic factors in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S66.

Fonseca AG, Pinto JASA, Marques MC, Drosdoski FS, Fonseca Neto LOR. Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amazônica Saúde** 2010; 1:85-90.

Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. **Virology** 2009; 384:410-4.

Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:298-306.

Fukata M, Chen A, Vamadevan AAS. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. **Gastroenterology** 2007; 133:1869-81.

Garg AD, Agostinis P. Cell death and immunity in cancer: from danger signals to mimicry of pathogen defense responses. **Immunol Rev** 2017; 280:126-48.

Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. **Nat Rev Drug Discov** 2009; 8:480-99.

Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle- controlled studies. **J Am Acad Dermatol** 2004; 50:722-33.

Ghosh A, Dasgupta A, Bandyopadhyay A. A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **Exp Mol Pathol** 2015; 99:720-4.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:709-20.

Glogauer JE, Sun CX, Bradley G, Magalhaes MA. Neutrophils increase oral squamous cell carcinoma invasion through an invadopodia-dependent pathway. **Cancer Immunol Res** 2015; 3:1218-26.

Goldszmid RS, Trinchieri G. The price of immunity. **Nat Immunol** 2012; 13:932-8.

Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. **Target Oncol** 2012; 7:29-54.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol** 2000; 38:357-61.

Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. **Mol Cell Biol** 1999;19:5785-99.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immuneresponse to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. **Nature** 2001; 410:1099-103.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science** 2004; 303:1526-9.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature** 2000; 408:740-5.

Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States 1998-2003. **Cancer** 2008; 113(10 Suppl):2883-91.

Heyns CF, Fleshner N, Sangar V, Schlenker B, Yuvaraja TB, van Poppel H. Management of the lymph nodes in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S43-57.

Huang B, Zhao J, Li H, He KL. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. **Cancer Res** 2005; 65:5009-14.

Iribarren K, Bloy N, Buque A, et al. Trial watch: Immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy. **Oncoimmunology** 2016; 5:e1088631.

Jouhi L, Koljonen V, Bohling T, et al. The expression of Toll-like receptors 2, 4, 5, 7 and 9 in Merkel cell carcinoma. **Anticancer Res** 2015; 35:1843-9.

Kakies Ch, Lopez-Beltran A, Comperat E, Erbersdobler A, Grobholz R. Reproducibility of histopathologic tumor grading in penile cancer--results of a European project. **Virchows Arch** 2014; 464:453-61.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. **Semin Immunol** 2007; 19:24-32.

Kim S, Cho SW, Min HS, et al. The expression of tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma. **Endocrinol Metab** Seoul 2013; 28:192-8.

Kipanyula MJ, Etet PFS, Vecchio L, Farahna M, Nukenine EN, Kamdje AHN. Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and cancer. **Cell Signal** 2013; 25:403-16.

Koifman L, Vides AJ, Koifman N, Carvalho JP, Ornellas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: Evaluation of 230 cases. **Int Braz J Urol** 2011; 37:231-40.

Kroon BK, Horenblas S, Lont AP, Tanis PJ, Gallee MP, Nieweg OE. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. **J Urol** 2005; 173:816-9.

La Rosa FA, Pierce JW, Sonenshein GE. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. **Mol Cell Biol** 1994; 14:1039-44.

Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. **N Engl J Med** 1991; 325:1205-9.

Lanki MA, Seppänen HE, Mustonen HK, et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 predict favorable prognosis in local pancreatic cancer. **Tumor Biol** 2018; 40:101042831880118.

LaRue H, Ayari C, Bergeron A, Fradet Y. Toll-like receptors in urothelial cells—targets for cancer immunotherapy. **Nat Rev Urol** 2013; 10:537-45.

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. **J Biol Chem** 1996; 271:20608-16.

Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspect Biol** 2009; 1:a001651.

Lee JW, Choi JJ, Seo ES, et al. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. **Mol Carcinog** 2007; 46:941-7.

Leijte JA, Gallee M, Antonini N, Horenblas S. Evaluation of current TNM classification of penile carcinoma. **J Urol** 2008; 180:933-8, discussion 8.

Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Res** 2006; 66:605-12.

Loesch M, Chen G. The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? **Front Biosci** 2008; 13:3581-93.

Lowe EL, Crother TR, Rabizadeh S. Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. **PLoS One** 2010; 5:e13027.

Lu H, Wu B, Ma G, et al. Melatonin represses oral squamous cell carcinoma metastasis by inhibiting tumor-associated neutrophils. **Am J Transl Res** 2017; 9:5361-74.

Mäkinen LK, Atula T, Häyry V, et al. Predictive role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in oral tongue squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2015; 51:96-102.

Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. **Dev Cell** 2007; 12:221-34.

Manipadam MT, Bhagat SK, Gopalakrishnan G, Kekre NS, Chacko NK, Prasanna S. Warty carcinoma of the penis: a clinicopathological study from South India. **Indian J Urol** 2013; 29:282-7.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. **Nature** 2008; 454:436-44.

Marconnet L, Rigaud J, Bouchot O. Long-term followup of penile carcinoma with high risk for lymph node invasion treated with inguinal lymphadenectomy. **J Urol** 2010; 183:2227-32.

Matijevic T, Pavelic J. Toll-like receptors: cost or benefit for cancer? **Curr Pharm Des** 2010; 16:1081-90.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. **Science** 2002; 296:301-5.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science** 2002; 296:298-300.

Mentrikoski MJ, Frierson Jr HF, Stelow EB, Cathro HP. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the penis: association with human papilloma virus infection. **Histopathology** 2014; 64:312-5.

Metcalf D. Myeloid growth factors. In: Gallin JI, Snyderman R, editors. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p.405-18.

Meyer C, Pries R, Wollenberg B. Established and novel NF- κ B inhibitors lead to downregulation of TLR3 and the proliferation and cytokine secretion in HNSCC. **Oral Oncol** 2011; 47:818-26.

Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsagué X, Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. **J Clin Pathol** 2009; 62:870-8.

Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: renal, penile, and testicular tumours. **Eur Urol** 2016; 70:93-105.

Montes Cardona CE, García-Perdomo HA. Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. **Rev Panam Salud Publica** 2017; 41:e117.

Moreno-Ramírez D, Ojeda-Vila T, Ríos-Martín JJ, Nieto-García A, Ferrándiz L. Association between tumor size and Breslow's thickness in malignant melanoma: a cross-sectional, multicenter study. **Melanoma Res** 2015; 25:450-2.

Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Med J** 2012; 24:69-71.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:518-27.

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2012; 4:a006049.

Ng LK, Rich AM, Hussaini HM. Toll-like receptor 2 is present in the microenvironment of oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer** 2011; 104:460-3.

Obeid LM, Hannun YA. Apoptosis and senescence of hematopoietic and immune cells. In: Gallin JI, Snyderman R, editors. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p.819-34.

Oriel JD. Natural history of genital warts. **Br J Vener Dis** 1971; 47:1-13.

Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BL, Wisnescky A, Koifman N, Quirino R. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian national cancer institute long-term experience. **J Surg Oncol** 2008; 97:487-95.

Paiva GR, de Oliveira Araújo IB, Athanzio DA, de Freitas LA. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. **Int Urol Nephrol** 2015; 47:295-9.

Pandey D, Mahajan V, Kannan RR. Prognostic factors in node-positive carcinoma of the penis. **J Surg Oncol** 2006; 93:133-8.

Pandey S, Singh S, Anang V, Bhatt AN, Natarajan K, Dwarakanath BS. Pattern recognition receptors in cancer progression and metastasis. **Cancer Growth Metastasis** 2015; 8:25-34.

Paner GP, Stadler WM , Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. **Eur Urol** 2018; 73:560-9.

Parkin DM. The global health burden infection-associated cancers in year 2002. **Int J Cancer** 2006; 118:3030-44.

Peng S, Trimble C, Wu L, Pardoll D, Roden R, Hung C-F. HLA-DQB1*02-restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4+T-cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2479-87.

Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. **Int J Biochem Cell Biol** 1997; 29:1433-48.

Pettaway CA, Srigley JR, Brookland RK, et al. Penis. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. editors. **AJCC cancer staging manual**. 8th ed. New York: Springer; 2017. p.701.

Philippou P, Shabbir M, Malone P, et al. Conservative surgery for squamous cell carcinoma of the penis: resection margins and long-term oncological control. **J Urol** 2012; 188:803-8.

Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science** 1998; 282:2085-8.

Pradere J-P, Dapito DH, Schwabe RF. The yin and yang of toll-like receptors in cancer. **Oncogene** 2014; 33:3485-95.

Pramanik R, Qi X, Borowicz S, et al. p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun: The determinant role of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. **J Biol Chem** 2003; 278:4831-9.

Prusty BK, Husain SA, Das BC. Constitutive activation of nuclear factor-kB: preferential homodimerization of p50 subunits in cervical carcinoma. **ABBV Front Biosci** 2005; 10:1510-9.

Puri PL, Wu Z, Zhang P, et al. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. **Genes & Dev** 2000; 14:574-84.

Radley D, Saah A, Stanley M. Persistent infection with human papillomavirus 16 or 18 is strongly linked with high-grade cervical disease. **Hum Vaccines Immunother** 2015; 12:768-72.

Ren T, Wen ZK, Liu ZM, Liang ZI, Guo ZL, Xu L. Functional expression of TLR9 is associated with metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis. **Cancer Biol Ther** 2007; 6:1704-9.

Ridnour LA, Cheng RYS, Switzer CH. Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment-poor prognosis or new therapeutic opportunity. **Clin Cancer Res** 2013; 19:1340-6.

Risco A, del Fresno C, Mambol A, et al. p38 γ and p38 δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012; 109:11200-5.

Ritchie AW, Foster PW, Fowler S, BAUS Section of Oncology. Penile cancer in the UK: clinical presentation and outcome in 1998/99. **BJU Int** 2004; 94:1248-52.

Robinson R, Marconi L, MacPepple E, Hakenberg OW, Watkin N, Yuan Y. Risks and benefits of adjuvant radiotherapy after inguinal lymphadenectomy in node-positive penile cancer: a systematic review by the European Association of Urology Penile Cancer Guidelines Panel. **Eur Urol** 2018; 74:76-83.

Ruan M, Zhang Z, Li S, Yang W, Wang L, Zhang C. Increased expression of Toll-like receptor-9 has close relation with tumour cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol** 2011; 56:877-84.

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. **Am J Pathol** 2001; 159:1211-8.

Saijo Y, Tanaka M, Miki M, et al. Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. **J Immunol** 2002; 169:469-75.

Sandholm J, Kauppila JH, Pressey C, et al. Estrogen receptor- α and sex steroid hormones regulate Toll-like receptor-9 expression and invasive function in human breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 132:411-9.

Sato Y, Gato Y, Narita N, Hoon DS. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. **Cancer Microenviron** 2009; 2(Suppl):205-14.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Müller-Hermelink HK, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. **Int J Med Microbiol** 2005; 295:179-85.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science** 2011; 331:1565-70.

Shanmugasundaram S, You J. Targeting persistent human papillomavirus infection. **Viruses** 2017; 9:E229.

Sharma P, Djajadiningrat R, Zargar-Shoshtari K, Catanzaro M, Zhu Y, Nicolai N. Adjuvant chemotherapy is associated with improved overall survival in pelvic node-positive penile cancer after lymph node dissection: a multi-institutional study. **Urol Oncol** 2015; 33:496.e17-23.

Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: The roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Adv Immunol** 2006; 90:1-50.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. **TNM classification of malignant tumors**. 7th ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2009. Penis; p.239.

Solsona E, Bahl A, Brandes SB, et al. New developments in the treatment of localized penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S36-42.

Stankiewicz E, Kudahetti SC, Prowse DM, et al. HPV infection and immunochemical detection of cell-cycle markers in verrucous carcinoma of the penis. **Mod Pathol** 2009; 22:1160-8.

Stern RS. Genital tumors among men with psoriasis exposed to psoralens and ultraviolet A radiation (PUVA) and ultraviolet B radiation: The Photochemotherapy Follow-up Study. **N Engl J Med** 1990; 322:1093-7.

Sun M, Djajadiningrat RS, Alnajjar HM, et al. Development and external validation of a prognostic tool for prediction of cancer-specific mortality after complete loco-regional pathological staging for squamous cell carcinoma of the penis. **BJU Int** 2015; 116:734-43.

Sun S, Pan X, Zhao L, Zhou J, Wang H, Sun Y. The expression and relationship of CD68-tumor-associated macrophages and microvascular density with the prognosis of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. **Clin Exp Otorhinolaryngol** 2016; 9:270-7.

Takenaka K, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. **Science** 1998; 280:599-602

Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M. Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. **Int J Oncol** 2010; 37:805-14.

Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. **Int J Cancer** 2011; 129:2183-93.

Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu Rev Immunol** 2012; 30:677-706.

Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of Toll-like receptors. **Infect Immun** 2000; 68:6883-90.

Van Howe RS, Hodges FM. The carcinogenicity of smegma: debunking a myth. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2006; 20:1046-54.

Velazquez EF, Ayala G, Liu H, et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:974-9.

Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. **Front Immunol** 2014; 5:367.

Wang N, Feng Y, Wang Q, et al. Neutrophils infiltration in the tongue squamous cell carcinoma and its correlation with CEACAM1 expression on tumor cells. **PLoS One** 2014; 9:e89991.

Williams JL, Ji P, Ouyang N, Liu X, Rigas B. NO-donating aspirin inhibits the activation of NF- κ B in human cell lines and Min mice. **Carcinogenesis** 2008; 29:390-7.

Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. **Mol Cell Biol** 2000; 20:3951-64.

Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, et al. Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load. **Cancer Epidemiol Biomark Prev** 2009; 18:3490-6.

Xie J, Lv R, Yu L, Huang W. Hydroxyethyl starch 130/0.4 exerts its anti-inflammatory effect in endotoxemic rats by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Ann Clin Lab Sci** 2010; 40:240-6.

Xu Y, Li N, Xiang R, Sun P. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. **Trends Biochem Sci** 2014; 39:268-76.

Yu L, Wang L, Chen S. Dual character of toll-like receptor signaling: pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions. **Biochim Biophys Acta** 2013; 1835:144-54.

Zequi Sde C, Guimarães GC, da Fonseca FP, et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer: a multicenter study. **J Sex Med** 2012; 9:1860-7.

Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. Toll-like receptors and prostate cancer. **Front Immunol** 2014; 5:352.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco - HCP

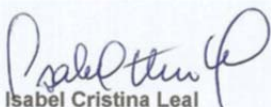


DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto de Pesquisa **CAAE: 39974314.2.0000.5205** intitulado: **“Avaliação da Expressão dos Toll Like Receptors e dos Fatores de Transcrição MYD88 e NFKB em Pacientes com Carcinoma Escamoso de Pênis e Infecção por Papilomavírus Humano (HPV).”**, pesquisador responsável **Felipe da Silva Marinho**, foi aprovado em 11 de fevereiro de 2015, pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer - SPCC / Hospital de Câncer de Pernambuco - HCP.

Os autores deverão remeter cópia do artigo publicado para arquivo na Biblioteca da SPCC / HCP e terão que mencionar nas publicações a Instituição onde o trabalho foi realizado.

Recife, 03 de março de 2015.


Isabel Cristina Leal
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer
Hospital de Câncer de Pernambuco

Anexo 2 - Sistema de estadiamento tumoral segundo a AJCC

Quadro do Sistema de estadiamento TNM AJCC 8º EDIÇÃO

TUMOR PRIMÁRIO (T)		
Tx	Tumor primário não pode ser identificado	
T0	Sem evidência de tumor primário	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	
Ta	Carcinoma localizado não invasivo	
T1	Glande: Tumor invade a lâmina própria Prepúcio: Tumor invade a dermis, lâmina própria ou a fáscia dartus Haste: Tumor invade o tecido conectivo entre a epiderme e o corpo, independente da localização	
T1a	O tumor não tem invasão linfovascular ou perineural e não é de alto grau (Ex. grau 3 ou sarcomatóide)	
T1b	O tumor tem invasão linfovascular e/ou perineural ou é de alto grau (Ex. grau 3 ou sarcomatóide)	
T2	Tumor invade o corpo esponjoso (Glande ou haste ventral) com ou sem invasão de uretra	
T3	Tumor invade o corpo cavernoso (Incluindo túnica albugínea) com ou sem invasão de uretra	
T4	Tumor invade estruturas adjacentes	
LINFONODOS REGIONAIS (N)		
	Clínico	Patológico
Nx	Não acessíveis	Não acessíveis
N0	Não palpáveis ou aumentados	Sem metástases linfonodais
N1	Linfonodo inguinal móvel unilateral	≤ 2 metástases inguinais unilaterais
N2	≥2 Linfonodos inguinais móveis unilateral ou linfonodos inguinais bilaterais	≥ 3 metástases inguinais unilaterais ou metástases bilaterais, sem extensão extranodal
N3	Massa inguinal palpável fixa ou linfadenomegalia pélvica uni ou bilateral	metástases com extensão extranodal ou metástases em linfonodos pélvicos
METÁSTASES A DISTÂNCIA (M)		
M0	Sem metástases a distância	
M1	Com metástases a distância	

Fonte: Adaptado de PANER et. al 2018

Quadro do Sistema de estadiamento TNM AJCC 7º EDIÇÃO

TUMOR PRIMÁRIO (T)		
Tx	Tumor primário não pode ser identificado	
T0	Sem evidência de tumor primário	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	
Ta	Carcinoma verrucoso não invasivo	
T1a	O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, sem invasão linfovascular ou de alto grau	
T1b	O tumor invade tecido conjuntivo subepitelial, com invasão linfovascular ou de alto grau	
T2	Tumor invade o corpo esponjoso ou cavernoso	
T3	Tumor invade invasão de uretra	
T4	Tumor invade estruturas adjacentes	
LINFONODOS REGIONAIS (N)		
	Clínico	Patológico
Nx	Não acessíveis	Não acessíveis
N0	Não palpáveis ou aumentados	Sem metástases linfonodais
N1	Linfonodo inguinal palpável e móvel unilateral	Metástase em um único linfonodo inguinal
N2	Linfonodos inguinais múltiplos ou bilaterais	Metástase múltiplas ou bilateral em linfonodos regionais
N3	Massa inguinal palpável fixa ou linfadenomegalia pélvica uni ou bilateral	metástases com extensão extranodal ou metástases em linfonodos pélvicos
METÁSTASES A DISTÂNCIA (M)		
M0	Sem metástases a distância	
M1	Com metástases a distância	

Fonte: Adaptado de SOBIN et al. (2009)

Apêndice 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido do paciente e do controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TOLL LIKE RECEPTORS , E DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO MYD88 E NFKB EM PACIENTES COM CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS**

Nome do Voluntário: _____

Você é um paciente matriculado no HCP com diagnóstico confirmado de câncer de pênis, em breve, será submetido a tratamento com cirurgia e/ou tratamento clínico. **Por isso está sendo convidado a participar de um projeto que envolve a coleta de sangue e de um fragmento do seu tecido tumoral.** Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

PROPÓSITO E OBJETIVO DO PROJETO

Este projeto é um esforço conjunto entre pesquisadores para utilizar os recentes avanços na medicina na tentativa de diagnosticar precocemente casos de câncer de pênis, como também buscar soluções que facilitem o tratamento dos pacientes com câncer pênis.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Voltamos a afirmar que você está sendo convidado para participar deste estudo e se concordar em participar, será necessária a realização de coleta de sangue, bem como, da coleta de amostras do tumor (fazer biopsias). Você não precisará ser submetido a nenhum procedimento a mais para participar desta pesquisa já que poderemos aproveitar a mesma biopsia que será realizada para fazer o seu diagnóstico.

Portanto, nada será retirado (nenhuma biopsia será realizada além da biópsia necessária para fazer seu diagnóstico e tratamento). Este material será armazenado em “congeladores” no Laboratório de pesquisa translacional-IMIP até o momento de ser utilizado na nossa pesquisa. Além disto, serão pesquisadas informações no seu prontuário, como por exemplo: idade, tipo do tumor e estadiamento do tumor após a cirurgia.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTARIA - Isto é apenas um convite.

Caso você não aceite o convite para participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este termo de Consentimento e nenhuma amostra será utilizada nem os seus registros médicos serão consultados.

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. Não haverá risco adicional para a obtenção de amostras para o presente estudo. Durante o projeto você terá o acompanhamento normal junto ao seu médico do HCP que é responsável pela sua assistência

BENEFÍCIOS

Possivelmente não haverá benefício para você diretamente durante o seu tratamento. Pode haver um benefício para seus familiares no caso de uma doença familiar ser diagnosticada.

Este estudo poderá, no entanto, resultar em benefícios para outras pacientes que terão o diagnóstico de câncer de Pênis e que irão fazer o tratamento.

Mapeamento genético da neoplasia maligna do pênis com a possibilidade de individualizar o tratamento para mais em tumores mais agressivos e menos invasivo em tumores não agressivos.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital de Câncer de Pernambuco e equipe de pesquisadores envolvidos. As amostras de tecido serão processadas de tal forma que sua privacidade e identidade sejam preservadas. Seu nome não será revelado ainda que as informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Caso você aceite este convite e se você tiver a necessidade de atendimento médico, durante ou após este estudo, este ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Caso você aceite este convite e se você tiver a necessidade de atendimento médico, você não terá qualquer custo ou forma de pagamento pela participação no projeto de pesquisa. A participação no projeto é voluntária e você não sofrerá nenhuma penalidade

caso não autorize a sua participação. Todo o seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no projeto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

Caso você aceite este convite, é importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de desistência, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Felipe Marinho no Telefone (81) 96661112. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma segunda pessoa imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, Avenida Cruz Cabugá 1597 Santo Amaro, telefones (81) 3217-8197. Email: cep@hcp.org.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco (CEP-HCP) que objetiva defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas.

O CEP-HCP está situado à Avenida Cruz Cabugá 1597 - Santo Amaro. Diretoria de Pesquisa do HCP, tel.: 3217-8197 - email: cep@hcp.org.br O CEP/HCP funciona de 2^a a 6^a feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30hs (manhã) e 13:30 às 16:00hs (tarde).

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho.

Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de

esclarecimentos permanentes. Ficou claro também estou isenta de despesas e que terei a 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 prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.

Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento, bem como retirada deste consentimento a qualquer momento. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

Se os meus materiais biológicos guardados Biorrepositório do Hospital de Câncer de Pernambuco forem utilizados em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, escolho livremente a opção abaixo assinalada:

Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

Desejo ser contatada para autorizar o uso dos meus materiais biológicos a cada pesquisa e em caso de impossibilidade de contato comigo, indico que a nova autorização seja fornecida pelo senhor

_____ **(nome e contato do familiar ou representante legal)**

Recife ____/____/____

Nome e assinatura do Paciente

Recife ____/____/____

Assinatura do Responsável

Legal/Testemunha Imparcial

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Controle saudável)

1. NOME DO CONVIDADO

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M . F .

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

..... CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M . F .

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE:(.....).....

1. TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TOLL LIKE RECEPTORS, E DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO MYD88 E NFkB EM PACIENTES COM CARCINOMA ESCAMOSO DE PÊNIS

2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: CARGO/FUNÇÃO:

Dr. Fernando Augusto Soares - Coordenador do setor de patologia do Hospital A. C. Camargo -SP

Dra. Leuridan Cavalcante Torres - Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Dr Felipe da Silva Marinho - Oncologista Clínico do HCPe

3. UNIDADE: Hospital do Cancer de Pernambuco, Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO_

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO_

RISCO BAIXO_

RISCO MAIOR_

6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

7. **O objetivo** deste trabalho é estudar a imunidade dos pacientes com câncer de mama. **Portanto, convidamos o senhor (a) para participar deste trabalho como indivíduo controle.**

8. Os testes laboratoriais serão relacionados com a imunidade.

9. Serão feitas coletas de 10 mL de sangue periférico para realização dos testes laboratoriais.

10. Existe um risco mínimo para o participante. A coleta poderá provocar uma mancha vermelha ou roxa no local da picada da agulha. Os pais dos pacientes serão orientados de como tratar, caso ocorra mancha vermelha ou roxa no local.

11. Não existe benefício direto **para a pessoa convidada.**

12. **15. Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do estudo. Os principais investigadores são Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Dr. Felipe da Silva Marinho que são encontrados no Departamento de Oncologia clínica do Hospital do Câncer de Pernambuco na Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife - PE (Telefone: 81 32178000); Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa do HCP na Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife - PE (Telefone: 81 32178000). Horário: segunda a sexta, das 8h as 12h e das 14h as 16h.**13. Os **convidados** poderão desistir de fazer parte da pesquisa.

14. Não serão divulgados os nomes dos **convidados.**

15. Os **convidados** poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.

16. Os **convidados** não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os participantes.

17. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue, o convidado tem o direito a tratamento médico no Hospital do Cancer de Pernambuco

18. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que meu filho (a) ou **convidado está isenta de despesas e que tem a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.** Concordo voluntariamente que meu filho (a) participe (ou em participar) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste serviço.

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho.

Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também estou isenta de despesas e que terei a 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 prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.

Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento, bem como retirada deste

consentimento a qualquer momento. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

Se os meus materiais biológicos guardados Biorrepositório do IMIP/HCP/GENOMIKA forem utilizados em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, escolho livremente a opção abaixo assinalada:

Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

Desejo ser contatada para autorizar o uso dos meus materiais biológicos a cada pesquisa e em caso de impossibilidade de contato comigo, indico que a nova autorização seja fornecida pelo senhor (A): _____

(nome e contato do familiar ou representante legal)

assinatura do participante

___/___/___

Data

___/___/___

Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial

Data

Recife, _____ de _____ 20____

Dra. Leuridan Cavalcante Torres

Dr. Felipe da Silva Marinho

(Pesquisadores responsáveis)

Apêndice 2 - Ficha clínica

FICHA CLÍNICA - PROJETO CÂNCER DE PÊNIS

1. NOME: _____
2. IDADE: _____
3. RG: _____
4. DATA _____
5. MATRICULA: _____
6. CASADO:
SIM () NÃO ()
7. HISTÓRIA DE DST
SIM () NÃO ()
8. ZOOFILIA
SIM () NÃO ()
9. LOCALIZAÇÃO DA LESÃO
GLANDE () CORPO () BASE ()
10. LINFONODOS PLAPAVEIS
SIM () NÃO ()
11. LHP
CEC () OUTROS ()
12. IHQ - p16
Positivo () Negativo ()
13. ESTADIAMENTO CLINICO
T ___ N ___ M ___
14. ULCERAÇÃO
SIM () NÃO ()
15. CIRURGIA
SIM () NÃO () QUANDO _____
16. TIPO DE CIRURGIA
FALECTOMIA () CIRURGIA CONSERVADORA ()
17. LHP CIRURGICO
Pt ___ pN ___
18. GRAU DE DIFERENCIAÇÃO
G1 () G2 () G3 () G4 ()
19. IPN
SIM () NÃO ()
20. IAL
SIM () NÃO ()
21. MARGENS COMPROMETIDAS

SIM () NÃO ()

10. METASTASES LINFONODAIS

SIM () NÃO ()

11. LINFONODO ACOMETIDO

INGUINAL () ILIACO ()

13. FEZ QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE

SIM () NÃO ()

14. FEZ RADIOTERAPIA ADJUVANTE

SIM () NÃO ()

15. RECIDIVA DE DOENÇA

SIM () NÃO () QUANDO _____

16. TEMPO PARA RECIDIVA

< 6 MESES () >6 MESES ()

17. RECIDIVA LOCAL

SIM () NÃO ()

18. RECIDIVA A DISTANCIA

SIM () NÃO ()

18. FEZ QUIMIOTERAPIA PALIATIVA

SIM () NÃO ()

22. OBITO

SIM () NÃO () QUANDO _____