

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DA
EXPRESSÃO DE PD-L1 EM CÉLULAS
TUMORAIS E CÉLULAS T NOS CARCINOMAS
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DO PÊNIS**

JOSUALDO JUSTINO ALVES JUNIOR

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Venício Alves
Lima**

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Alves Junior, Josualdo Justino

Análise imunoistoquímica da expressão de PD-L1 em células tumorais e células T nos carcinomas de células escamosas do pênis /

Josualdo Justino Alves Junior - São Paulo, 2019.

106p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Carcinoma de Células Escamosas/genética/Carcinoma, Squamous Cell/genetics. 2. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Sobrevivência (Saúde Pública)/Survival. 5. Estudos Retrospectivos/Retrospective Studies

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal
algun, porque o Senhor está comigo”

Salmo 23

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **JOSUALDO** e **LÚCIA**, por sua maneira de educar, ajudando-me e orientando-me nos momentos difíceis de minha vida e a minha esposa **ANA AMÉLIA**, pelo companheirismo, incentivo constante, carinho e por sua paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **DEUS** por me dar a oportunidade de chegar até aqui, completando assim, mais uma vez, uma etapa, das várias que ainda virão na minha vida, e sem o qual nada disso seria possível.

A todos os pacientes que enfrentam o medo e a insegurança diante do diagnóstico de câncer de pênis e que acreditam que os profissionais de saúde estão empenhados na descoberta da cura de tão funesta doença ou, pelo menos, procurando novas tecnologias que amenizem os sofrimentos e tornem a vida mais digna, meu profundo agradecimento e gratidão. É a sua luta contínua, altiva e digna, que nos ensina e estimula a sermos melhores médicos.

Aos meus pais, **JOSUALDO JUSTINO ALVES** e **MARIA LÚCIA FERNANDES ALVES**, pelo amor incondicional e dedicação exaustiva à educação de seus filhos e por tantas vezes terem abdicado de suas vontades para satisfazer as dos filhos.

À minha esposa, amiga e companheira, **ANA AMÉLIA GADELHA MARTINS ALVES**, pelo amor, fortalecido aos poucos em nossa convivência diária, pela atenção e palavras de incentivo constantes, pelos momentos inesquecíveis ao seu lado e pela amizade sincera.

Ao meu orientador Professor Doutor **FERNANDO AUGUSTO SOARES**, por me aceitar como orientando e ter enfrentado comigo todas as adversidades à realização deste projeto. Professor nós vencemos!!! Muito Obrigado!!

Ao meu co-orientador Professor Doutor **MARCOS VENÍCIO ALVES LIMA**, por me aceitar, de novo, como orientando e pela confiança, paciência

e atenção despendidas na confecção deste estudo e, principalmente, pelo exemplo de profissional médico e professor. Agradeço-lhe, ainda, pelo apoio e orientação direta, evitando armadilhas, enfrentando desafios e acima de tudo sugerindo trilhas na condução deste e dos outros trabalhos que desenvolvemos. Professor não tem como não lhe chamar de Mestre!!!

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital São Luiz da Rede D'Or sede Jabaquara em São Paulo, **MARINA FRANÇA DE RESENDE, SIMONE CRISTIANE PAGOTI e CARLOS FERREIRA NASCIMENTO** pelo empenho e presteza para atender às solicitações do orientador.

A todos os **FUNCIONÁRIOS do SERVIÇO DE ARQUIVO MÉDICO - SAME** do Instituto do Câncer do Ceará - ICC, pelo empenho e presteza para atender minhas solicitações de busca aos prontuários.

Ao Professor Doutor, **MANFREDO LUIZ LINS E SILVA**, pelo incentivo e por ter permitido durante todos estes anos a minha participação nos projetos da **ESCOLA CEARENSE DE ONCOLOGIA**.

Ao **INSTITUTO DO CÂNCER DE CEARÁ – ICC / HOSPITAL HAROLDO JUAÇABA**, pela oportunidade de desenvolvimento desta e de outras pesquisas em suas dependências, fato este que me fez despertar para a pesquisa científica deste a graduação.

RESUMO

Alves Junior JJ. **Análise imunoistoquímica da expressão de PD-L1 em células tumorais e células T nos carcinomas de células escamosas do pênis.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado- Fundação Antônio Prudente]

Introdução: A neoplasia do pênis é uma doença rara, sendo mais frequente nos países em desenvolvimento. Representa 0,4% dos tumores malignos dos homens nos EUA e 2,1% no Brasil, sendo mais prevalente nas regiões norte e nordeste. O carcinoma epidermóide representa aproximadamente 95% das neoplasias do pênis e sua ocorrência está ligada à presença de fimose, higiene inadequada e infecções virais. O PD-1 e seu ligante PD-L1 são proteínas de membrana com papel crucial na regulação da resposta imune. O aumento da expressão de PD-L1 parece ser um mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro pelas células tumorais e tem sido alvo de diversos estudos. **Objetivos:** estabelecer a frequência da Expressão da proteína PD-L1 e das células T nos carcinomas de pênis, correlacionando os aspectos demográficos e clínico-patológicos com a expressão das tendências do câncer de pênis no Estado do Ceará. **Métodos:** Tratou-se de estudo retrospectivo, transversal, clínico-patológico e imunoistoquímico de câncer de pênis em pacientes tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC). A amostra constituiu-se de 84 pacientes com diagnóstico de câncer de pênis acompanhados no HHJ/ICC, entre 2002 e 2014. Os dados foram obtidos através de revisão dos prontuários e do preenchimento de formulário elaborado pelos pesquisadores. Foi preparado TMA a partir de amostras dos blocos de parafina dos tumores. A imunoistoquímica foi realizada a partir das lâminas do TMA. Os dados foram tabulados, armazenados e processados através do programa estatístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) Versão 22.0. **Resultados:** A média de idade foi de 67,6 anos com a maioria oriunda do interior do Estado (65,5%) e casados (68,7%).

Amputação parcial foi a cirurgia mais realizada (82,14%) e a maioria dos tumores tinha até 5cm (77,4%). Tivemos cerca de 31% pT1 e 21,5% pN positivo. O subtipo usual foi o prevalente (67,9%) e os carcinomas moderadamente diferenciados (61,9%) tiveram maior representatividade. Houve recidiva em cerca de 21% dos casos. Quanto ao PD-L1 houve expressão em 22,6% dos casos. Houve significância estatística para a associação entre a expressão de PD-L1 com Células Inflamatórias ($p=0,000$), CD4 ($p=0,001$), CD8 ($p=0,012$) e estágio pT ($p=0,02$). Também houve para a associação entre a expressão de Células Inflamatórias com CD4 ($p=0,004$), CD8 ($p=0,000$), estágio pT ($p=0,001$), grau histológico ($p=0,03$) e diferenciação histológica ($p=0,04$). Quanto ao prognóstico, a recidiva ($p=0,017$), o estágio pT ($p=0,027$) e o grau histológico ($p=0,020$) mostraram-se como fatores de impacto na sobrevida. **Conclusão:** Trata-se de uma neoplasia que acomete mais a sexta década da vida. A recidiva, o estadiamento patológico (pT) e o grau histológico ratificaram-se como fatores prognósticos relevantes na sobrevida. A expressão de PD-L1 em tumores avançados reforça a importância de continuar a pesquisa para investigação adicional de anti-PD-1 e imunoterapêuticos anti-PD-L1 em pacientes com neoplasia peniana avançada. Reforça-se ainda que por se tratar de um problema de saúde pública, campanhas de conscientização quanto aos sintomas devem ser incentivadas para que se possa fazer o diagnóstico mais precocemente, o que poderia diminuir as taxas de incidência de tumores em estágio avançado e propiciar cirurgias menos mutilantes.

Descritores: PD-L1. Carcinoma de Células Escamosas/genética. Neoplasias Penianas. Imuno-Histoquímica. Sobrevivência (Saúde Pública). Estudos Retrospectivos.

SUMMARY

Alves Junior JJ. **[Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in tumor cells and T cells in penile squamous cell carcinomas]**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado- Fundação Antônio Prudente]

Introduction: Penile neoplasia is a rare disease, being more frequent in developing countries. It represents 0.4% of the malignant tumors of the men in the USA and 2.1% in Brazil, being more prevalent in the north and northeast regions. Epidermoid carcinoma accounts for approximately 95% of penile neoplasms, and its occurrence is linked to the presence of phimosis, inadequate hygiene and viral infections. PD-1 and its PD-L1 linkers are membrane proteins with crucial role in the regulation of the immune response. Increased PD-L1 expression appears to be a mechanism for evading the host immune system by tumor cells and has been the subject of several studies. **Objectives:** To establish the frequency of PD-L1 protein and T-cell expression in penile carcinomas, correlating demographic and clinical-pathological aspects with the expression and trends of penile cancer in the State of Ceara. **Methods:** Retrospective, cross-sectional, clinical-pathological and immunohistochemical study of penile cancer in patients treated and followed up at Haroldo Juaçaba Cancer Hospital of the Cancer Institute of Ceara (HHJ / ICC). The sample consisted of 84 patients with a diagnosis of penile cancer in the HHJ / ICC, between 2002 and 2014. The data were obtained by reviewing the medical records and filling out a form prepared by the researchers. TMA was prepared from samples of the paraffin blocks of the tumors. Immunohistochemistry was performed from the TMA slides. Data were tabulated, stored and processed using the statistical program Statistical Package for Social Science (SPSS) Version 22.0. **Results:** The mean age was 67.6 years, with the majority coming from the interior of the State (65.5%) and married (68.7%). Partial amputation was the most performed surgery (82.14%) and the majority of tumors had up to 5 cm

(77.4%). We had about 31% pT1 and 21.5% pN positive. The usual subtype was the prevalent one (67.9%) and the moderately differentiated carcinomas (61.9%) were more representative. There was recurrence in about 21% of the cases. Regarding PD-L1, there was 22.6% of cases. There was statistical significance for the association between PD-L1 expression with Inflammatory Cells ($p = 0.000$), CD4 ($p = 0.001$), CD8 ($p = 0.012$) and pT stage ($p = 0.02$). There was also an association between the expression of CD4 ($p = 0.004$), CD8 ($p = 0.000$), pT ($p = 0.001$), histological grade ($p = 0.03$) and histological differentiation, 04). As for the prognosis, the relapse ($p = 0.017$), the pT stage ($p = 0.027$) and the histological grade ($p = 0.020$) were shown as survival impact factors. **Conclusion:** This is a neoplasm that affects the sixth decade of life. Recurrence, pathological staging (pT) and histological grade were ratified as relevant prognostic factors in survival. The expression of PD-L1 in advanced tumors reinforces the importance of continuing the research for further investigation of anti-PD-1 and anti-PD-L1 immunotherapeutics in patients with advanced penile neoplasia. It is also reinforced that because it is a public health problem, awareness campaigns about the symptoms should be encouraged so that the diagnosis can be made earlier, which could reduce the incidence rates of advanced tumors and provide surgeries less mutilating.

Key-words: PD-L1. Carcinoma, Squamous Cell/genetics. Penile Neoplasms. Immunohistochemistry. Survival. Retrospective Studies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxas brutas de mortalidade por carcinoma peniano no Brasil entre 1075-2016	3
Figura 2	Estrutura do FGFR e isoformas (IIIb e IIIc) geradas por splicing alternativo dos transcritos do FGFR.....	22
Figura 3	Sinalização mitogênica disparada por FGF/FGFR.....	24
Figura 4	Mecanismos reguladores da expressão de PD-1.....	31
Figura 5	Mecanismos reguladores da expressão de PD L1.....	31
Figura 6	Foto do Aparelho de TMA utilizado no nosso estudo.....	47
Figura 7	Histograma das idades dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014	51
Figura 8	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao tipo de cirurgia realizada	53

Figura 9	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao estágio patológico	56
Figura 10	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao envolvimento linfonodal	57
Figura 11	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a diferenciação histológica	58
Figura 12	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao status final	61
Figura 13	Expressão de PD-L1 em células tumorais	64
Figura 14	Expressão de PD-L1 em células inflamatórias	64

Figura 15	Expressão de PD-L1 em células CD4	65
Figura 16	Expressão de PD-L1 em células CD8	65
Figura 17	Estimador de <i>Kaplan-Meier</i> para a curva de sobrevida global dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014	74
Figura 18	Estimador de <i>Kaplan-Meier</i> para a curva de sobrevida de acordo com a recidiva nos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014	75
Figura 19	Estimador de <i>Kaplan-Meier</i> para a curva de sobrevida de acordo com o status linfonodal dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014	76
Figura 20	Estimador de <i>Kaplan-Meier</i> para a curva de sobrevida de acordo com a expressão de PD-L1 em células tumorais dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014	77

- Figura 21** Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com o estágio pT dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014 78
- Figura 22** Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com o grau histológico dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014 79
- Figura 23** Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com a invasão neural dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014 80
- Figura 24** Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com a idade dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014 81

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	TNM 2017	16
Quadro 2	Estágios	17
Tabela 1	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a procedência.	51
Tabela 2	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao estado civil	52
Tabela 3	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto à etnia	52
Tabela 4	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a realização de esvaziamento linfonodal.....	54

Tabela 5	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a localização do tumor.....	55
Tabela 6	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao tamanho do tumor.....	56
Tabela 7	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao grau histológico.....	58
Tabela 8	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão vascular	59
Tabela 9	Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão da uretra	59

Tabela 10 Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão neural	60
Tabela 11 Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão de órgãos adjacentes	60
Tabela 12 Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a recidiva do tumor	61
Tabela 13 Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas células tumorais	62
Tabela 14 Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas Células Inflamatórias Infiltrantes de Tumor	62

Tabela 15 Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas células CD4.....	63
Tabela 16 Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas células CD8.....	63
Tabela 17 Associação entre a expressão de PD-L1 em células tumorais e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.....	66
Tabela 18 Associação entre a expressão de PD-L1 em Células Inflamatórias e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.....	68
Tabela 19 Associação entre a expressão de PD-L1 em CD4 e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.....	69

Tabela 20 Associação entre a expressão de PD-L1 em CD8 e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.....	71
Tabela 21 Associações significantes entre a expressão de PD-L1 em Células Tumorais, Células Inflamatórias, CD4 e CD8 e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.....	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFP	Alfa-fetoproteína
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CaPe	Câncer de Pênis
CD4	Linfocitos T CD4
CD8	Linfocitos T CD8
CE	Carcinoma epidermoide
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CSF	Fatores estimuladores de colônias
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
HPV	<i>Human papiloma virus</i>
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleucinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LELC	<i>Lymphoepithelioma-like carcinoma</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NGF	Nerve Growth Factor
NK	<i>Natural killer</i>
PD-1	<i>Programmed cell death</i>
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PD-L1	Programmed death-ligand 1
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UICC	<i>Union for Internactional Cancer Control</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Pênis: Aspectos Gerais e Epidemiológicos	1
1.2	Etiopatogenia do Carcinoma de Pênis	5
1.2.1	Fimose / Não Circuncisão.....	5
1.2.2	Vírus do Papiloma Humano.....	6
1.2.3	Liquen Escleroso Atrófico e a Leucoplasia-Condições Inflamatórias ..	8
1.2.4	Outros Fatores de Risco.....	9
1.3	Aspectos Morfológicos do CaPE	10
1.3.1	Os Carcinomas não-Relacionados com o HPV	12
1.3.2	Carcinomas Relacionados ao HPV	14
1.4	Estadiamento.....	16
1.5	Fatos e Problemas Relevantes.....	17
1.6	Considerações Sobre Ciclo Celular e a Importância da Abordagem Molecular	19
1.7	Aspectos da Imunologia	25
1.7.1	Relembrando Conceitos	25
1.7.2	Antígenos Tumoriais	27
1.7.3	Checkpoint Imunológico	29
1.7.4	O PD-L1.....	29
1.7.5	PD-L1 e Câncer de Pênis.....	33
1.8	Justificativa para o Estudo.....	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo Primário	36
2.2	Objetivos Secundários.....	36
3	MATERIAL E METODOLOGIA.....	37
3.1	Desenho do Estudo e Aspectos Éticos.....	37
3.2	População e Amostra do Estudo	37

3.3	Local e Período	38
3.4	Critérios de Elegibilidade e Procedimentos para Seleção dos Pacientes.....	38
3.5	Instrumento.....	39
3.6	Descrição das Variáveis Estudadas	40
3.6.1	Idade	40
3.6.2	Procedência.....	40
3.6.3	Etnia	40
3.6.4	Fimose.....	40
3.6.5	Estado Civil.....	41
3.6.6	Tipo de Cirurgia	41
3.6.7	Estadiamento.....	41
3.6.8	Esvaziamento Linfonodal.....	41
3.6.9	Localização do Tumor	42
3.6.10	Tamanho do Tumor	42
3.6.11	Diferenciação Histológica	42
3.6.12	Grau Histológico	42
3.6.13	Invasão Vascular	43
3.6.14	Invasão Uretra	43
3.6.15	Invasão Neural	43
3.6.16	Invasão de Órgãos Adjacentes.....	43
3.6.17	Recidiva.....	44
3.6.18	Estado Final.....	44
3.6.19	Expressão da Proteína PD-L1 nas Células Tumorais	44
3.6.20	Expressão das Células Inflamatórias Infiltrantes do Tumor (TILS)....	45
3.6.21	Expressão de CD4	45
3.6.22	Expressão de CD8	45
3.7	Construção do TMA.....	46
3.8	Caracterização Imunoistoquímica.....	47
3.9	Análise Estatística	48

4	RESULTADOS	50
4.1	Descrição das Variáveis Demográficas e Clínicas	50
4.1.1	Distribuição quanto à Idade	50
4.1.2	Distribuição quanto à Procedência	51
4.1.3	Distribuição quanto ao Estado Civil	51
4.1.4	Distribuição quanto à Etnia	52
4.1.5	Distribuição quanto ao Tipo de Cirurgia	53
4.1.6	Distribuição quanto ao Esvaziamento Linfonodal	53
4.1.7	Distribuição quanto à Localização do Tumor	53
4.1.8	Distribuição quanto ao Tamanho do Tumor	54
4.1.9	Distribuição quanto ao Estadiamento Patológico – PT	56
4.1.10	Distribuição quanto ao Estadiamento Patológico – PN	57
4.1.11	Distribuição quanto à Diferenciação Histológica	57
4.1.12	Distribuição quanto ao Grau Histológico	58
4.1.13	Distribuição quanto à Presença de Invasão Vascular	59
4.1.14	Distribuição quanto à Presença de Invasão da Uretra	59
4.1.15	Distribuição quanto à Presença de Invasão Neural	59
4.1.16	Distribuição quanto à Presença de Invasão em Órgãos Adjacentes	60
4.1.17	Distribuição quanto à Presença de Recidiva	60
4.1.18	Distribuição quanto ao Status Final	61
4.2	Descrição dos dados da Imunoistoquímica	62
4.2.1	Expressão de PD-L1	62
4.2.2	Presença de Células Inflamatórias	62
4.2.3	Expressão de CD4	63
4.2.4	Expressão de CD8	63
4.3	Análises Estatísticas	66
4.3.1	Análise Univariada	66
4.3.2	Análise Multivariada	72
4.4	Análises de Sobrevida	74
4.4.1	Sobrevida Global	74
4.4.2	Sobrevida Global de acordo com a Recidiva	75
4.4.3	Sobrevida Global de acordo com o Status Linfonodal	76

4.4.4	Sobrevida Global de acordo com a Expressão de PD-L1	77
4.4.5	Sobrevida Global de acordo com o Estadio PT	78
4.4.6	Sobrevida Global de acordo com Grau Histológico	79
4.4.7	Sobrevida Global de acordo com Invasão Neura	80
4.4.8	Sobrevida Global de acordo com Idade	81
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÕES	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

APÊNDICE

Apêndice 1 Formulário de coleta de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PÊNIS - ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer de pênis (CaPe) é um tumor pouco frequente, de homens acima dos 50 anos, embora possa atingir também os mais jovens. No nordeste brasileiro há taxas que chegam a 5,7% de todos os tumores malignos do homem, superando as taxas de câncer na próstata e na bexiga (SILVA et al. 2014). Como é sabido, nesta região do país há as piores condições socioeconômicas, fator intrinsecamente ligado à etiopatogenia do tumor, e concentram mais da metade das neoplasias malignas do pênis do Brasil (FAVORITO et al. 2008). Isto é diferente de países desenvolvidos onde o CaPe é pouco frequente, representando cerca de 0,6% de todas neoplasias malignas (MOSCONI et al. 2005; BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007; JEMAL et al. 2013; SEWELL et al. 2015). No Reino Unido, equivale a 0,6/100000 habitantes e o *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program-SEER* (National Cancer Institute-NCI 2018) estima que houve cerca de 2120 casos novos no ano de 2017 nos Estados Unidos.

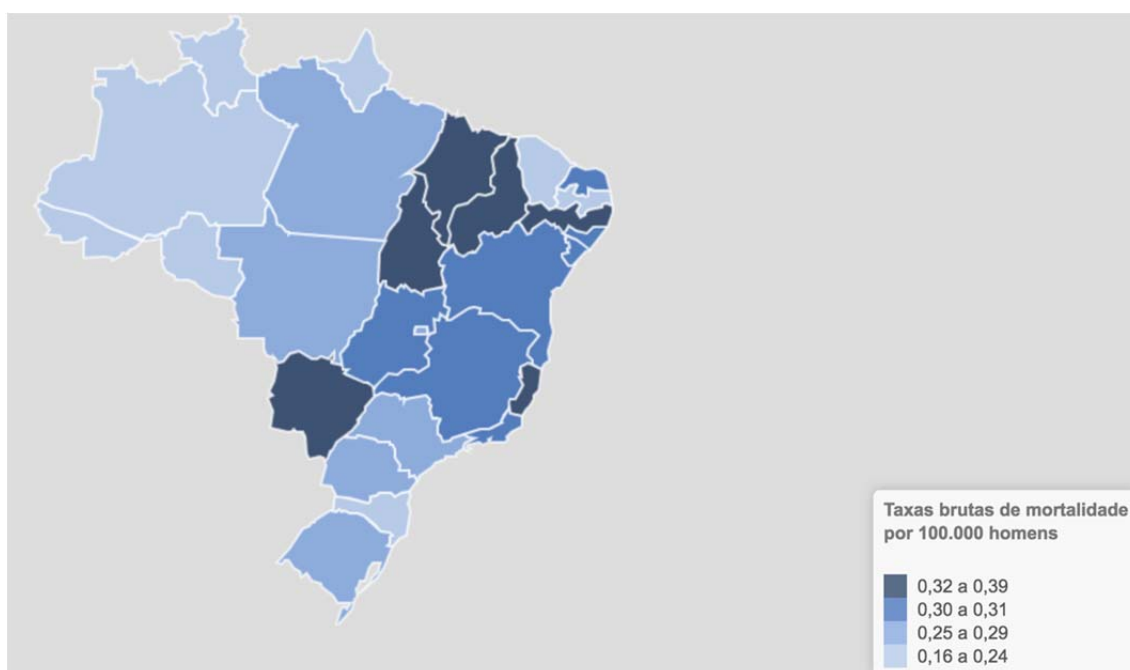
A Austrália tem uma incidência de CaPe de 0,8/100000 habitantes e o País de Gales esta incidência é de 1,44/100000 (SEWELL et al. 2015). Surpreendentemente, a Suécia tem uma incidência de 2,1/100000 homens, sendo que esta se mantém estável (KIRRANDER et al. 2016). Estes quadros

de incidência nos países desenvolvidos incluem todos os estádios e a grande maioria são de diagnósticos de tumores precoces. Por exemplo, na Suécia mais do que 50% dos casos são Tis ou pT1, e cerca de 70% destes são tratados com cirurgia conservadora (KIRRANDER et al. 2016).

Como inicialmente comentado esta não é a realidade em países onde o índice de desenvolvimento humano é menor. Em alguns países africanos, asiáticos ou sul-americanos as incidências giram em torno de 4,0 casos/100.000 homens (WABINGA et al. 2000; RUBIN et al. 2001). Mesmo nos Estados Unidos, há diferenças do estágio ao diagnóstico quando comparadas diferentes populações (SLOPNICK et al. 2016).

Apesar de pouco frequente nos Estados Unidos da América (EUA), em 2008, HU e GOLDIE descreveram o impacto econômico do CaPe nos EUA. Os custos relacionados com o CaPe incluem consultas médicas de atenção primária, cirurgia, anestesia, internação hospitalar, radioterapia, quimioterapia e consultas com médico especialista. No CaPe avançado, são adicionados cuidados relacionados ao aumento da morbidade associada, ou seja, incontinência urinária e disfunção sexual. As estimativas de custos incluem os custos diretos médicos relacionados ao tratamento inicial (ou seja, os honorários médicos, hospitalização, cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia) ao acompanhamento em curto prazo (um ano). Não foram incluídos gastos com a avaliação diagnóstica, a vigilância a longo prazo, o tratamento de doença recorrente, a gestão da doença metastática ou o cuidado terminal. Dessa forma, o custo médio por caso foi calculado em aproximadamente 15 mil dólares (HU e GOLDIE 2008).

As estimativas do Instituto Nacional de Câncer não são precisas pois o enquadram juntamente com outros tipos de tumor. No Brasil, esse tipo de tumor representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, sendo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste, conferindo grande importância para o seu estudo (Ministério da Saúde 2017). O Atlas de Mortalidade por Câncer do Inca registra mortalidade de 0,28/100.000, estimando que no período de 1979 a 2016 houveram 8700 mortes por este tumor. As taxas de mortalidade nos estados brasileiros podem ser vistas na Figura 1, sendo que o Ceará, estado objeto deste estudo, foi de 0,21/100000 (Ministério da Saúde 2017).



Fonte: Ministério da Saúde (2017)

Figura 1 - Taxas brutas de mortalidade por carcinoma peniano no Brasil entre 1975-2016.

Em levantamento publicado em 1982 por BRUMINI et al. a neoplasia correspondia a cerca de 2,1% das neoplasias malignas que acometiam o sexo masculino no Brasil. As regiões que concentram o maior número de casos são Nordeste (5,7%), Norte (3,8%) e Centro-Oeste (3,8%). A incidência é menor no Sudeste (1,4 %) e no Sul (1,2%).

O CaPe ocorre principalmente entre a quinta e a sétima décadas de vida. Trata-se de um tumor infrequente em adultos na faixa etária de até 30 anos e é raramente descrito na infância (POW-SANG et al. 2010). No Brasil, a incidência é maior a partir dos 46 anos de idade (FAVORITO et al. 2008). Porém, a condição de doença que acomete homens em idade mais avançada pode ser alterada, uma vez que um quarto dos casos são de pacientes com menos de 50 anos (SALVIONI et al. 2009).

A despeito do impacto dessa neoplasia, há poucos estudos que ofereçam dados confiáveis em relação aos aspectos morfológicos e às variações locorregionais existentes no Brasil. Aspectos epidemiológicos levando em considerações hábitos e comportamentos sexuais locais, variantes histológicas pouco conhecidas ou não contempladas na classificação vigente da OMS que evoluem de forma não usual podem embutir considerações importantes para o manejo desses pacientes (BEZERRA et al. 2001a, b).

1.2 ETIOPATOGENIA DO CARCINOMA DE PÊNIS

A etiopatologia dos tumores malignos do pênis é pouco conhecida, porém alguns fatores já foram associados com maior risco para desenvolvimento da neoplasia, tais como fimose, não circuncisão, más condições de higiene, vários parceiros sexuais, infecção pelo HPV, verrugas genitais ou outros antecedentes venéreos, lesões e inflamações crônicas, e o tabagismo (BLEEKER et al. 2009; SALVIONI et al. 2009; MINHAS et al. 2010; PAHWA et al. 2012).

1.2.1 Fimose / Não Circuncisão

A fimose é um fator de risco universalmente aceito. Pacientes portadores de CaPe apresentam com bastante frequência. A falta de possibilidade de exposição da glândula e sua higienização levam ao acúmulo de esmegma (composto por produtos urinários e células epidérmicas da descamação natural) na região peniana. A retenção do esmegma pode acarretar irritação crônica e inflamação da glândula, que por sua vez criam uma condição propícia ao desenvolvimento de neoplasias.

A circuncisão pode estar associada à redução do risco para desenvolvimento do CaPe, uma vez que permite melhor higienização da glândula e também reduz a incidência de lesões e inflamações nessa área (DILLNER et al. 2000; BLEEKER et al. 2009). A postectomia quando realizada ao nascimento é mais eficaz na proteção ao desenvolvimento de CaPe, do que quando é realizada mais tardiamente. Tal fato é corroborado

pela incidência praticamente nula desses tumores em populações que realizam esse procedimento em recém-nascidos, por motivos religiosos ou culturais. A frequência de CaPe é maior em homens não postectomizados na infância, com risco relativo 1,5 vezes maior quando comparados a indivíduos do grupo controle (DALING et al. 2005).

A maior incidência de câncer de pênis em pacientes não postectomizados também se deve ao fato de que esses indivíduos, além de desenvolverem fimose, apresentam risco aumentado para aquisição de outras infecções venéreas como a infecção pelo HPV (do inglês, *human papiloma virus*) e persistência desta.

1.2.2 Vírus do Papiloma Humano

O HPV é um vírus oncogênico, cujo papel na progressão tumoral já é bem estabelecido nos carcinomas de colo de útero. Diversos estudos que avaliaram a presença de infecção pelo HPV em CaPe chegaram a resultados bastante controversos, tanto a respeito da incidência da infecção quanto do papel desta na tumorigênese e no prognóstico da doença (RUBIN et al. 2001; SCHEINER et al. 2008) A infecção por esse vírus parece participar como um cofator na carcinogênese desse tumor, atuando em conjunto com vários outros elementos (BEZERRA et al. 2001a, b).

A ocorrência da infecção viral parece ser mais frequente em pacientes não postectomizados devido a características histológicas do pênis. O corpo do pênis, assim como a superfície externa do prepúcio, apresentam

ceratinização. Já a mucosa interna do prepúcio, não ceratinizada, é mais vulnerável à infecção (CASTELLSAGUÉ et al. 2002).

A detecção do DNA do HPV já foi descrita em 14,6% a 81,5% dos tumores (BACKES et al. 2009). Os HPV's de alto risco, principalmente os tipos 16 e 18, são os mais frequentemente encontrados nos tumores de pênis. O HPV 16 pode ser encontrado em até 79% dos casos com infecção viral (BEZERRA et al. 2001a, b; RUBIN et al. 2001; PROWSE et al. 2008; KRUSTRUP et al. 2009).

Apesar da prevalência da infecção pelo HPV ser considerável, o valor prognóstico da presença do vírus nos tumores de pênis é controverso. Existem estudos relatando que a presença do vírus nos tumores não acarreta qualquer alteração no prognóstico dos pacientes (BEZERRA et al. 2001a, b; RUBIN et al. 2001; SCHEINER et al. 2008). No entanto, outro estudo sugere que a detecção do HPV parece estar associada a tumores com crescimento mais agressivo e de alto grau histológico (GREGOIRE et al. 1995).

Resultados que contrariam o estudo anterior foram verificados por LONT et al. (2006) que observaram que os pacientes com infecção pelos HPV's de alto risco apresentaram maior sobrevida câncer específica em 5 anos do que aqueles do grupo negativo. O mesmo fato foi observado por um estudo que avaliou a presença do HPV em amostras de pacientes brasileiros (SCHEINER et al. 2008). No estudo de BEZERRA et al. (2001a, b) a positividade para o HPV só esteve associada com menor risco para

embolização linfática, não sendo observadas associações com outras variáveis de prognóstico.

Apenas dois achados parecem ser consenso nos diversos estudos que avaliaram a frequência de tumores com infecção pelo HPV, a prevalência dos subtipos virais e a distribuição da infecção de acordo com o tipo histológico. O HPV16 é o mais frequentemente encontrado no CaPe, podendo ser encontrado em 25% a 87% das lesões nas quais foi detectado DNA viral. Os subtipos histológicos basalóide e condilomatoso são os que apresentam as maiores taxas de infecção pelo HPV e nos carcinomas verrucosos é rara a presença do vírus (CHAN et al. 1994; RUBIN et al. 2001; BACKES et al. 2009; KRUSTRUP et al. 2009; MIRALLES-GURI et al. 2009).

1.2.3 Liquen Escleroso Atrófico e a Leucoplasia - Condições Inflamatórias

A pele da genitália masculina é semelhante à do restante do tegumento, sendo a única exceção aquela localizada na face interna do prepúcio e na glândula, onde o epitélio não é queratinizado (LYNCH e PETTAWAY 2002).

Algumas dermatoses que são comuns em regiões extragenitais, como a leucoplasia e o liquen escleroso atrófico, podem afetar o pênis e estar relacionadas ao CaPe.

A leucoplasia é um termo amplo e inespecífico que clinicamente significa uma lesão esbranquiçada e espessada, rara em pênis e mais comumente observada em pacientes diabéticos. Acredita-se que 7% a 13%

das lesões leucoplásicas não tratadas evoluam para carcinoma epidermóide (RAGSDALE 2009).

O líquen escleroso é uma dermatose inflamatória crônica que pode acometer a região anogenital. Clinicamente, os principais achados são: hipocromia, atrofia e xerose com ou sem descamação. Os trabalhos publicados sobre o assunto divergem em muito nos resultados. Em 80% dessas lesões, o exame histopatológico mostra alterações reacionais benignas (RAGSDALE 2009). Estudo realizado por POWELL et al. (2001) encontrou associação entre líquen escleroso e CaPe em 50% dos participantes. Já no estudo de YESUDIAN et al. (2005) em apenas 4-5% dos casos, puderam ser encontradas características de carcinoma epidermóide invasivo. Outros autores referem até 6% de associação de líquen escleroso e CaPe (NASCA et al. 1999).

1.2.4 Outros Fatores de Risco

Outros hábitos como a obesidade, o tabagismo e a zoofilia têm sido implicados como fatores de risco para a doença.

O estudo de BARNES et al. (2016) descreveu associação significativa entre a obesidade e o CaPe, sendo esta descrita como um fator de risco modificável no desenvolvimento do CaPe.

O tabagismo é, certamente, uma das principais causas de câncer no mundo. Desde o clássico estudo de DOLL e HILL (1950), que identificou a estreita associação entre consumo de cigarros e câncer de pulmão, novas evidências foram acumuladas para outros tumores malignos. Para o CaPe o

risco chega a até 4,5 vezes em alguns estudos (DALING et al. 2005). Um dos primeiros trabalhos em que hipotetizou que o acúmulo de nicotina e substâncias cancerígenas no muco cervical de mulheres fumantes, assim como em secreções penianas, foi o de WINKELSTEIN et al. (1977), no qual descreveram que a ação carcinogênica do tabaco em células epiteliais não era promovida somente por contato direto, mas também por via circulatória por TSEN et al. (2001).

A associação entre a zoofilia ou SWA (do inglês, sex with animals) e o CaPe foi descrita recentemente em estudo nacional de ZEQUI et al. (2012). Neste estudo o SWA emergiu como um fator de risco para CaPe sob a hipótese de que promove o contato dos tecidos penianos com a mucosa genital não-humana, resultando em microtraumas e exposição às secreções anogenitais dos animais, que podem ser carcinogênicas para humanos. Essa situação favoreceria os processos de irritação crônica e subsequente displasia o que pode levar a lesões penianas, escoriações ou balanites que são conhecidas por aumentar o risco de CaPe (ZEQUI et al. 2012).

A injúria traumática também foi associada ao desenvolvimento do CaPe provavelmente devido ao processo inflamatório crônico (TSEN et al. 2001; THOMAS e NANGIA 2004)

1.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CaPe

A maior parte das neoplasias malignas do pênis é constituída por carcinomas derivados do epitélio pluriestratificado, tanto da glândula como do

sulco coronal e prepúcio que representam aproximadamente 95% dos casos (BEZERRA et al. 2001a, b). Esta diferenciação é importante pois o CaPe raramente se origina na pele e é, em sua grande maioria dos casos tumores nascidos na mucosa. O CaPe geralmente se inicia como uma lesão em glânde que, se não tratada, pode se estender para o prepúcio e o corpo, invadindo corpos cavernosos, corpo esponjoso e uretra e chegando à autoamputação. Existem 3 padrões de crescimento: superficial (crescimento horizontal), invasivo (crescimento vertical) e multicêntrico (LOPES et al. 1996; GUIMARÃES et al. 2006; POW-SANG et al. 2010).

CHAUX et al. (2010) reviram os subtipos histológicos de CaPe. Os CaPe são divididos em diversos subtipos histológicos. Dentre as variantes mais frequentes estão o tipo usual, verrucoso, condilomatoso, papilífero e basalóide. Outras variantes mais raras são o sarcomatóide, adenoescamoso e acantolítico.

A Organização Mundial da Saúde-OMS recentemente confirmou as diversas variantes histopatológicas (MOCH et al. 2016). Como os próprios autores justificam, a atual classificação é o produto da evolução histórica do conhecimento. Um dos aspectos mais importantes é que claramente estabelece uma divisão relacionada com a etiopatogenia, os CaPe associados ao HPV e os tumores não-associados ao HPV. Dentre os primeiros estão os carcinomas basalóides, condilomatosos e o carcinoma do tipo linfóepitelioma. Entre os não-relacionados com HPV estão o carcinoma epidermóide e suas variantes, o carcinoma verrucoso, o carcinoma

papilífero, o carcinoma adenoescamoso, o carcinoma sarcomatóide e os carcinomas mistos.

A despeito de sermos um país onde o CaPe é frequente, os aspectos histopatológicos ainda não são de conhecimento comum dos patologistas. Frequentemente eles são classificados de forma errônea e todos colocados como CEC usuais. Isto impede que os clínicos e cirurgiões estabeleçam estratégias mais adequadas de tratamento e, especialmente, selecionem pacientes elegíveis para a linfadenectomia inguinal (LOPES et al. 1996; ORNELLAS et al. 1994, 2008).

1.3.1 Os Carcinomas não-Relacionados com o HPV

Os carcinomas epidermóides usuais são o subtipo histológico mais comum, representam 48% a 65% das neoplasias penianas (CHAUX et al. 2010). Macroscopicamente, apresenta-se como uma lesão esbranquiçada que pode ser exofítica, de crescimento horizontal ou ulcerada. Recidivas são observadas em 28% dos pacientes e metástase linfonodais são detectadas em 28% a 39% dos casos. Aproximadamente 20% a 38% dos pacientes morrem em decorrência da doença e taxa de sobrevida em 10 anos é de 78% (CHAUX et al. 2010).

O carcinoma verrucoso responde por 3% a 8% dos casos (CHAUX et al. 2010). Seu crescimento é lento e agressivo, porém local, com raros relatos de metástases inguinais, e mortalidade praticamente nula. O grau de diferenciação é alto e raramente apresenta infecção pelo HPV.

Os tumores papilíferos correspondem a 5% a 15% dos carcinomas de pênis (CHAUX et al. 2010). Tratam-se de lesões exofíticas extensas e, microscopicamente, irregular e infiltrativo e baixo grau de diferenciação. Lesões pré-neoplásicas, como a neoplasia intraepitelial e o líquen escleroso, estão frequentemente associadas a essa variante. As taxas de recidiva, metástase linfonodal e mortalidade são baixas, em torno de 10%.

O carcinoma sarcomatóide é responsável por 1% a 3% dos CaPe (CHAUX et al. 2010). É uma neoplasia agressiva que envolve preferencialmente a glândula, mas o prepúcio também pode ser afetado. O componente sarcomatóide pode imitar o histiocitoma fibroso, o leiomiossarcoma, o fibrossarcoma, o mixossarcoma ou o angio-sarcoma e estudos imuno-histoquímicos podem ser necessários para um diagnóstico correto (CUBILLA et al. 2001). Metástase nodal inguinal é observada em 75% -89% dos casos, a taxa de mortalidade é alta (40% -75%), recorrências locais e sistêmicas desenvolvem-se em até dois terços dos pacientes e a maioria morre em um ano de diagnóstico (VELAZQUEZ et al. 2005).

O carcinoma adenoescamoso é um tumor raro, composto por células escamosas entremeadas por áreas de diferenciação glandular (ROMERO et al. 2006). Microscopicamente, observa-se um padrão de adenocarcinoma misto de produção de mucina de células escamosas (CUBILLA et al. 1996; KAGEYAMA et al. 1997). O componente escamoso predomina. Glândulas coram com antígeno carcinoembrionário. Recorrências locais foram observadas em um quarto dos casos e as metástases nos linfonodos

inguinais aparecem em até metade dos pacientes, mas a taxa de mortalidade é baixa (0% a 14%) (GUIMARÃES et al. 2009).

1.3.2 Carcinomas Relacionados ao HPV

Os carcinomas condilomatosos são geralmente pouco diferenciados e decrescimento lento. Frequentemente estão associados a infecções pelo HPV (20% a 100% dos casos). Apresenta crescimento papilomatoso e geralmente invade corpos cavernoso e esponjoso. O comprometimento linfonodal é observado em 18% dos casos e recidivas locais acometem 10% dos pacientes. A mortalidade associada à doença varia de 0% a 9% (CHAUX et al. 2010).

O tipo basalóide é um tumor agressivo associado à infecção pelo HPV em até 80% dos casos. Representa entre 4% a 10% dos carcinomas de pênis. Assim como o subtipo condilomatoso, costuma invadir corpos cavernosos e esponjoso, porém apresenta-se como uma lesão ulcerada e preferencialmente na glândula. As taxas de recidiva e metástases linfonodais são elevadas em torno de 30% e 50% a 100% dos casos, respectivamente. Aproximadamente um terço dos pacientes morrem devido a metástases a distância (CHAUX et al. 2010).

O carcinoma do tipo linfoepitelioma (do Inglês, *Lymphoepithelioma-like carcinoma*, LELC) é um carcinoma pouco diferenciado que deriva seu nome do chamado linfoepitelioma ou carcinoma nasofaríngeo diferenciado, uma neoplasia com forte ligação patogênica à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (MENTRIKOSKI et al. 2014). Embora morfologicamente idêntica

ao carcinoma nasofaríngeo indiferenciada, as LELCs que surgem em outros órgãos geralmente não estão relacionadas à infecção subjacente por EBV (MENTRIKOSKI et al. 2014). Quando ocorrem no trato geniturinário, o LELC é mais frequentemente encontrado na bexiga urinária (WILLIAMSON et al. 2011). Embora o LELC do pênis pareça ser extremamente raro, o conhecimento dessa variante é fundamental para prevenir diagnósticos como um processo inflamatório, particularmente o linfoma, e, em muitos casos, a imunoistoquímica é necessária para a classificação adequada (MENTRIKOSKI et al. 2014).

Não obstante à dificuldade na classificação dos vários subtipos do CaPe, a etiopatogenia molecular se constitui num grande desafio. A casuística reduzida e a distribuição irregular ao longo do Brasil, aliadas à falta de boa documentação científica e clínico-cirúrgica, constituem agravantes para que se evolua nos conceitos e propostas terapêuticas.

Trabalhos envolvendo o conhecimento da expressão de proteínas através de imunoistoquímica vêm se avolumando e despertado a necessidade de aprofundarmos os conhecimentos ao nível molecular, e que isso possa contribuir efetivamente com descobertas científicas que resultem na predição do comportamento clínico e no tratamento mais efetivo dos pacientes com CaPe (CAMPOS et al. 2006; SOARES et al. 2006; MUNEER et al. 2009; FICARRA et al. 2010; GOU et al. 2013). As proteínas de maior interesse e possível valor preditivo atualmente são: p16, p53, periostina (GUNIA et al. 2012a, b; 2013), EGFR e RASSF1A (GOU et al. 2013).

1.4 ESTADIAMENTO

O estadiamento do CaPe é realizado utilizando-se a o TNM da *Union for International Cancer Control* (UICC) conforme ilustrado nos quadros 1 e 2 (BRIERLEY et al. 2017).

Quadro 1 - TNM 2017

T - Tumor primário	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Carcinoma verrucoso não invasivo,
T1	Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial
T1a	sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado) (Grau 1-2)
T1b	com invasão linfovascular ou pouco diferenciado/indiferenciado (Grau 3-4)
T2	Tumor invade o corpo esponjoso/corpo cavernoso
T3	Tumor invade a uretra
T4	Tumor invade outras estruturas adjacentes
N - Linfonodos regionais (Clínico e Patológico)	
cNx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
cN0	Sem linfonodos inguinais aumentados visíveis ou palpáveis
cN1	Linfonodo inguinal palpável móvel unilateral
cN2	Linfonodos inguinais palpáveis móveis múltiplos ou bilaterais
cN3	Massa de linfonodos inguinais fixa ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral
pNx	pNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
pN0	pN0 Ausência de metástase em linfonodos regionais
pN1	pN1 Metástase intranodal em um único linfonodo inguinal
pN2	pN2 Metástases em múltiplos linfonodos inguinais ou em linfonodos inguinais bilaterais
pN3	pN3 Metástases em linfonodo(s) pélvico(s), unilaterais ou bilaterais, ou extensão extranodal de metástases em linfonodos regionais
M - Metástase à distância	
Mx	Metástases à distância não pode ser avaliada
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância

Fonte: Adaptado de BRIERLEY et al. (2017).

Quadro 2 – Estágios

Estágio			
Estágio 0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
Estágio I	T1a	N0	M0
Estágio II	T1b	N0	M0
	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Estágio IIIa	T1-3	N1	M0
Estágio IIIb	T1-3	N2	M0
Estágio IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de BRIERLEY et al. (2017).

1.5 FATOS E PROBLEMAS RELEVANTES

As abordagens empregadas no tratamento do tumor primário dependem da extensão da doença e tem como objetivos a melhora da sobrevida, preservação do órgão e redução da ocorrência de morbididades (LIMA et al. 2007). Tumores em estágio inicial e de crescimento superficial podem ser tratados através de procedimentos mais conservadores que envolvem ressecção cirúrgica da lesão, radioterapia ou laser. Nos casos avançados, a penectomia parcial ou total ainda se fazem necessárias, acompanhadas de linfadenectomia (LONT et al. 2006; LIMA et al. 2007; SALVIONI et al. 2009).

O principal fator prognóstico no CaPe é a presença ou não de acometimento linfonodal pela neoplasia. Em uma série brasileira,

frequentemente referenciada em outros trabalhos, LOPES et al. (1996) descrevem estudo sobre 145 pacientes submetidos à amputação do pênis e linfadenectomia ilioinguinal bilateral dentre os quais 76 pacientes (52.4%) apresentaram metástases linfonodais. Nesta série, os fatores que contribuíram significativamente para a presença de metástases linfonodais foram: a embolização linfática, embolização venosa, espessura do tumor maior que 5 mm e a detecção clínica de linfonodos tumorais de localização unilateral. Em outras séries, o estágio T e o grau de diferenciação histológica têm se mostrado fatores importantes no risco de desenvolvimento de metástases (CUBILLA et al. 2005). A presença de alguns genes de HPV's oncogênicos, embora presentes frequentemente nos tumores penianos, não são fatores com significância estatística para metástases linfonodais (VILLA e LOPES 1986).

É fato reconhecido que o estágio clínico desses tumores é impreciso. Aproximadamente 20% dos pacientes com linfonodos clinicamente negativos têm metástases ocultas, e 50% daqueles com linfonodos inguinais palpáveis não têm histologia positiva para neoplasia quando operados (PIZZOCARO et al. 1995). Esta imprecisão diagnóstica tem grande importância, pois o principal problema a ser resolvido em pacientes portadores de carcinoma peniano invasivo, é saber quem deve ou não ser submetido à linfadenectomia visto que tal procedimento representa uma morbidade elevada. Um estudo com um total de 106 linfadenectomias realizadas em 53 pacientes obteve um alto percentual (58%) de complicações sendo as mais

frequentes: seroma prolongado, necrose dos retalhos, linfedema, trombose venosa profunda e 01 (um) óbito (THOMAS et al. 2002).

Neste contexto, novas modalidades prognósticas, e quiçá terapêuticas, urgem para decisão de terapias adequadas para os pacientes portadores de CaPe. Até o momento, a literatura a respeito dos aspectos moleculares do CaPe é escassa. Inclusive marcadores frequentemente alterados e amplamente estudados em carcinomas epidermóides de outros sítios anatômicos foram pouco avaliados nas neoplasias de pênis. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos biológicos envolvidos na tumorigênese dessa neoplasia. Ainda se fazem necessários mais estudos visando à identificação de marcadores moleculares de prognóstico, uma vez que as variáveis clínicas e anatomopatológicas empregadas na determinação do prognóstico são imprecisas e não permitem o delineamento adequado dos pacientes, que muitas vezes são submetidos a procedimentos desnecessários e associados a muitas morbidades.

1.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE CICLO CELULAR E A IMPORTÂNCIA DA ABORDAGEM MOLECULAR

O ciclo celular de células dos mamíferos é influenciado por substâncias que foram denominadas de fatores de crescimento. O primeiro desses fatores descoberto foi um peptídeo que estimula o crescimento de nervos, mais especificamente produz uma hiperplasia de gânglios simpáticos de embriões de galinha. Esse fator, denominado de fator de crescimento do

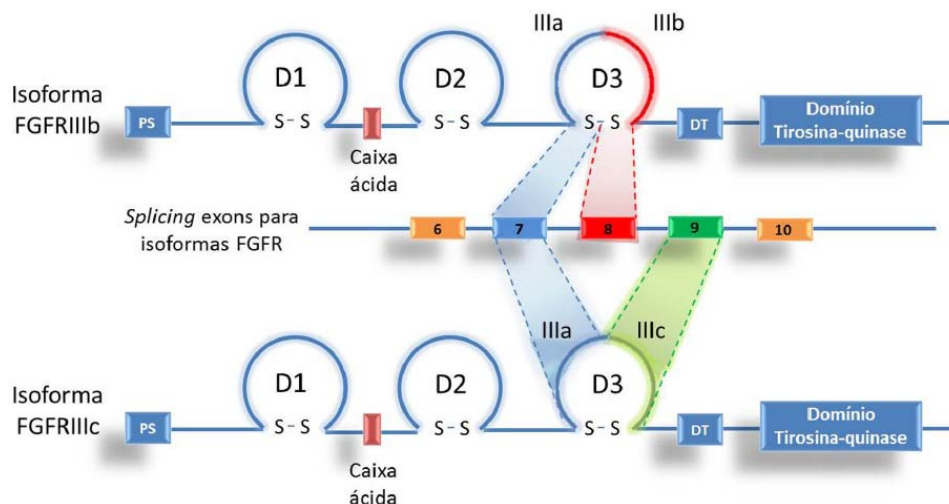
nervo (NGF – Nerve Growth Factor), foi inicialmente extraído de culturas de células de camundongo. Posteriormente, outros fatores peptídicos foram descobertos, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF – Fibroblast Growth Factor), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – Platelet Derived Growth Factor) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF – Insulin-like Growth Factor). A proliferação das células é controlada pela concentração dos fatores de crescimento que agem fundamentalmente em fases do ciclo celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1995).

Tumores surgem quando os mecanismos normais de controle da proliferação são genética ou epigeneticamente alterados, comprometendo a regulação de vias de sinalização. Diversas vias são ativadas por exemplo pela proteína Ras o que torna essa proteína constitutivamente ativa e muito comum em um grande número de cânceres (DOWNWARD 2003), contribuindo significativamente para vários aspectos do fenótipo maligno, mas também conferindo vulnerabilidades específicas a essas células (SHAW et al. 2011) e essas vulnerabilidades podem ser potenciais alvos estratégicos de terapias anticâncer.

Escolhemos a sinalização iniciada por FGF/FGFR para ilustrar a multiplicidade de vias ativadas e alguns dos eventos de inibição/ativação cruzada entre elas (*cross-talks*).

Os FGFs (do inglês “Fibroblast Growth Factor”, ou fatores de crescimento de fibroblastos), formam uma família de proteínas que

receberam a nomenclatura baseada na origem de sua atividade biológica promotora de proliferação em fibroblastos em cultura (ORNITZ e ITOH 2011; DRAPER et al. 2004). Os FGFRs (*Fibroblast Growth Factor Receptors* ou receptores de fatores de crescimento de fibroblasto) são receptores transmembranares. Em humanos quatro genes de *FGFR* (FGFR -1 a -4) foram identificados (ITOH e ORNITZ 2004; BEENKEN e MOHAMMADI 2009; TURNER e GROSE 2010). Os FGFR-1 a 4 correspondem a receptores do tipo tirosina-quinase (aproximadamente 800 aminoácidos) localizados na membrana plasmática. Destes receptores, os FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 podem sofrer arranjos transcricionais alternativos (*alternative splicing*), possibilitando a formação de duas isoformas (b e c) que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs (ORNITZ et al. 1996; ITOH e ORNITZ 2004) (Figura 2).



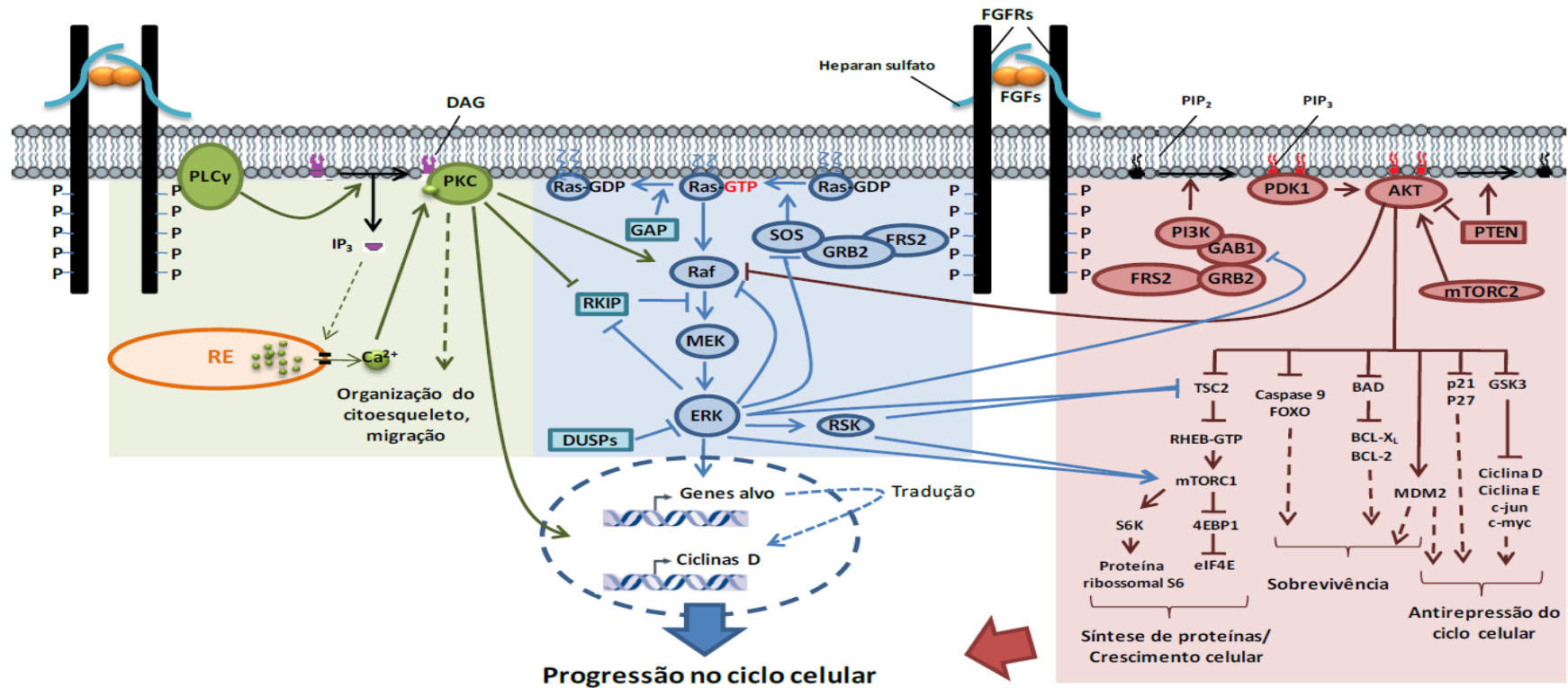
Fonte: Adaptado de CHAVES et al. (2011).

Figura 2 - Estrutura do FGFR e isoformas (IIIb e IIIc) geradas por splicing alternativo dos transcritos do FGFR. A estrutura dos FGFRs é ilustrada e inclui um peptídeo sinal (PS), três domínios Ig (D1-D3), uma caixa ácida, domínio transmembranar (DT) e um domínio tirosina quinase. As duas formas são geradas por splicing alternativos dos exons 8 e 9. A porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 8 para gerar a isoforma FGFR IIIb, enquanto a porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 9 para gerar a isoforma FGFR IIIc.

O FGF se liga a receptores específicos (FGFR) presentes na membrana celular, entre as regiões D2 e D3, formando um complexo ternário (2FGF- 2FGFR-HS). Subsequentemente tem-se ativação do receptor, através da autofosforilação cruzada dos resíduos de tirosina citoplasmáticos presentes no FGFR (MOHAMMADI et al 2005; KALININA et al. 2009). Esses resíduos fosforilados são reconhecidos por SH-2 e outras proteínas adaptadoras, como Grb2 e Shc. Grb 2 se liga a SOS, formando um complexo que ativa o oncoproteína Ras (Ras-GDP \rightarrow Ras-GTP), que dispara uma cascata de sinalização envolvendo Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK1/2. A via de ativação de Ras é crucial para a proliferação induzida por FGF (BOILLY et al. 2000).

Outra via ativada por FGF é a de PLC γ , que hidrolisa fosfatidilinositol, formando IP3 (inositol 3-fosfato) e diacilglicerol, liberando íons Ca⁺² e ativando PKC (NUGENT e IOZZO 2000) (Figura 3). A ativação das vias Ras/ERK e de PI3K resultam na entrada das células na fase S do ciclo celular (Figura 3).

Ainda pouco se conhece sobre a etiopatogenia molecular do CaPe. A maioria dos trabalhos diz respeito à expressão imunoistoquímica de proteínas, com poucos casos e escassas informações clínicas. Dada à escassez de dados cientificamente sólidos no conhecimento do CaPe e, principalmente, pela importância que esta doença devastadora tem no Brasil, o presente projeto visa estabelecer um estudo com abordagens científicas atuais que possam contribuir efetivamente com descobertas científicas que resultem na predição do comportamento clínico e no tratamento mais efetivo dos pacientes com CaPe.



Fonte: Retirada de ZEIDLER (2012)

Figura 3 - Sinalização mitogênica disparada por FGF/FGFR. O complexo formado por dois FGFs, duas cadeias de heparan-sulfato e dois FGFRs aproxima estreitamente seus domínios tirosina quinase levando a transfosforilação de tirosinas da região intracelular. FRS2 (*FGFR substrate 2*) é fosforilada, criando novos sítios de ancoragem para outras proteínas adaptadoras, entre elas GRB2 (*Growth factor Receptor Bound protein 2*), a qual recruta SOS (*Son Of Sevenless*), uma GEF responsável pela ativação da via Ras/MAPK (em azul); A via PI3K/AKT é ativada mediante GAB1 (*GRB2 Associated Binding protein 1*), em vermelho. PLCγ liga-se diretamente a uma fosfotirosina C-terminal de FGFR, desencadeando a ativação de PKC (em verde).

1.7 ASPECTOS DA IMUNOLOGIA

1.7.1 Relembrando Conceitos

Sabemos que o sistema imune é composto por várias estruturas, como os tecidos linfóides (medula óssea, timo, linfonodos, baço) e células livres no sangue (granulócitos, linfócitos e fagócitos), sendo, portanto, capaz de responder aos agentes agressores de várias maneiras, já que estes, também, se apresentam de várias formas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1995). Existem dois tipos de respostas imunes: a resposta imune inata e resposta imune adaptativa. Toda e qualquer resposta imune abrange o reconhecimento e a eliminação do patógeno.

O sistema imune inato já nasce pronto e funcional no hospedeiro e as células que participam na resposta imune inata são os fagócitos, que compreendem os monócitos, macrófagos e neutrófilos. Os mecanismos envolvidos aqui não são específicos e não têm memória.

O sistema imune adaptativo, por sua vez, é altamente específico para o agente infeccioso, memorizando-o e tornando-se cada vez mais eficiente a cada encontro com o patógeno. Ele desenvolve-se após o nascimento do hospedeiro e as células mais atuantes são os linfócitos que reconhecem especificamente o agente agressor (ABBAS et al. 2000). Eles podem ser agrupados em duas categorias: os linfócitos T (células T) e os linfócitos B (células B). Os linfócitos B dispõe um receptor específico que reconhece seu antígeno específico e desencadeia a sua proliferação e diferenciação em plasmócitos que são as células que produzem os anticorpos. Já os linfócitos

T atuam liberando fatores solúveis (citocinas) que funcionam como sinais para a ativação de outras células. Por possuírem funções diversas são subdivididos em: **Linfócitos T auxiliares (Ta)** ativam outras células para efetivar as respostas imunes; **Linfócitos T citotóxicos (Tc)**, são importantes na destruição de células infectadas por vírus ou outros parasitas celulares, bem como células cancerosas e transplantadas; **Linfócitos T supressores (Ts)** são responsáveis pela inibição das células T auxiliares, T citotóxicas, fagócitos e produção de anticorpos, causando uma depressão no sistema imune. As células T supressoras são importantes na inibição das respostas imunes contra os antígenos próprios do hospedeiro, como acontece nas doenças auto- imunes; **Linfócitos T de memória** que exercem o papel de memorizar o agente patógeno para um posterior encontro (ROITT et al. 2013).

Existem alguns tipos de interação entre os linfócitos e os fagócitos (ABBAS et al. 2000). Os macrófagos, por exemplo, são muito importantes na apresentação de antígenos para os linfócitos T. As células T são capazes de reconhecer antígenos, porém estes devem ser originados na própria célula e apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade ou MHC (do inglês *major histocompatibility complex*) como peptídeos. O MHC é uma região genética que faz com que o sistema imune diferencie o próprio do não-próprio. O MHC é único para cada pessoa e as moléculas de classe I estão presentes em todas as células enquanto as de classe II têm distribuição mais restrita, limitando-se às células apresentadoras de antígenos (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1995; ROITT et

al. 2013). Os linfócitos T CD4⁺ interagem com moléculas de classe II do MHC enquanto os linfócitos T CD8⁺ com moléculas de classe I do MHC (ABBAS et al. 2000).

Existem uma série de moléculas importantes nas respostas imunes, tais como as citocinas que enviam sinais para outras células para efetivar a resposta imune. As citocinas se classificam em três principais grupos: **os interferons (IFNs)**, que promovem resistência contra vírus em células não infectadas; **as interleucinas (ILs)**, que estão envolvidas na divisão e diferenciação celular e **os fatores estimuladores de colônia (CSFs)**, que são responsáveis pelas divisões e diferenciações de células-tronco e células progenitoras de leucócitos. Além destas, existem outros tipos de citocinas, como o **fator de necrose tumoral (TNF)** que é muito importante nas respostas citotóxicas.

Além dos linfócitos existem outros tipos celulares citotóxicos, tais como as **células matadoras naturais ou NK** (do inglês, *natural killer*) que destroem as células alvo sem a necessidade de estas expressarem moléculas do MHC, tanto de classe I quanto de classe II.

1.7.2 Antígenos Tumorais

A imunologia tumoral se baseia no fato de que as células tumorais expressam antígenos que as distinguem das células normais. Esses antígenos podem ser, de maneira didática, divididos em 2 grupos: **os antígenos tumorais exclusivos ou tumor-específicos** que só estão presentes nas células tumorais. Neste grupo estão todas as proteínas

codificadas por genes mutados em tumores; e os **antígenos associados a tumores** que podem ocorrer em algumas células normais, porém a expressão quantitativa ou associada a outros marcadores serve para identificar as células tumorais (ABBAS et al. 2000).

Os antígenos tumorais podem ser detectados por linfócitos T e por anticorpos. Os reconhecidos pelos linfócitos T são considerados os principais alvos da resposta imune protetora nos animais e no homem e, por isso, são muito estudados nas pesquisas sobre imunologia dos tumores. As moléculas de classe I do MHC expressam peptídeos em todas as células nucleadas, inclusive as tumorais. Mas, estas células tumorais expressam proteínas mutadas ou que não são produzidas por uma célula normal acarretando o reconhecimento destes antígenos pelos linfócitos T CD8⁺ do hospedeiro. Desta maneira, as células tumorais agem como células apresentadoras de antígenos (APCs), exibindo seus próprios antígenos às células T.

Os antígenos tumorais em que há uma grande especificidade da resposta imune são chamados de antígenos de transplante específicos de tumor (ATETs).

Os antígenos oncofetais são antígenos de diferenciação presentes durante o desenvolvimento fetal, mas que normalmente não são expressos na vida adulta. Esses antígenos (como a alfa-fetoproteína, AFP e o antígeno carcinoembrionário, CEA), no entanto, são expressos por células tumorais. O CEA tem sua expressão é intensificada nos carcinomas de cólon, pâncreas e estômago e a AFP tem níveis altos encontrados no soro de

pacientes com carcinoma hepatocelular, tumores de células germinativas e cânceres gástricos e pancreáticos.

1.7.3 Checkpoint Imunológico

O termo **Checkpoint imunológico** é utilizado para um modulador do sistema imunológico, que permite o início da resposta imune e previne o aparecimento de autoimunidade. Exemplos de tal molécula são Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4 ou CD152), que é um receptor inibitório encontrados em células do sistema imunológico, que tem um papel importante na regulação, impedindo a ativação de células T. Tumores tem os checkpoints imunológicos como importantes mecanismos de resistência imune, particularmente contra as células T que são específicos para antígenos tumorais. Portanto, a estratégia de utilizar checkpoints imunológicos na terapia do câncer é para a inibir moléculas inibitórias do sistema imunológico, dessa maneira, estimulando o sistema imunológico.

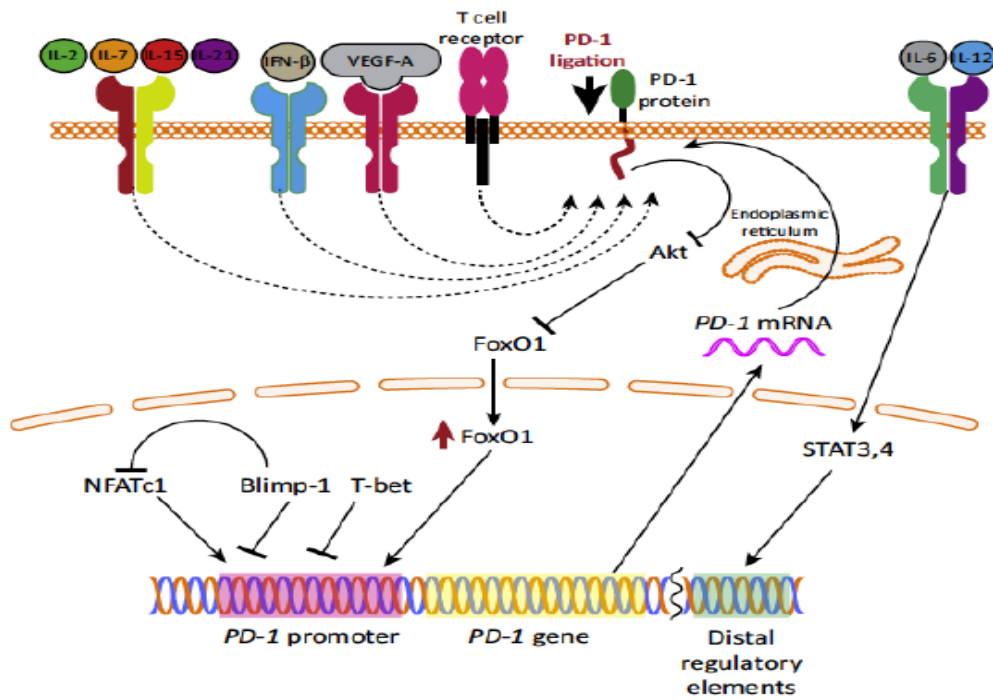
1.7.4 O PD-L1

ISHIDA et al. descobriram e descreveram em 1992 a PD-1 (do inglês, *programmed cell death*), uma proteína de membrana tipo I, de 268 aminoácidos pertencente à uma família de moléculas reguladoras de células T, chamada CD28/B7, que funciona como uma molécula coestimulatória negativa, regulando processos de autoimunidade e infecção (SHARPE et al. 2007).

Dois anos mais tarde, SHINOHARA et al. (1994) descreveram que ela é codificada pelo gene PDCD1. Possui um domínio extracelular IgV, seguido de uma região transmembrana e uma cauda intracelular, a qual contém dois sítios de fosforilação (BLANK et al. 2004; BLANK e MACKENSEN 2007). Esta proteína é expressa na superfície de células T ativadas, células B e macrófagos, o que sugere que ela é capaz de inibir a resposta imune celular de maneira mais ampla (BLANK e MACKENSEN 2007).

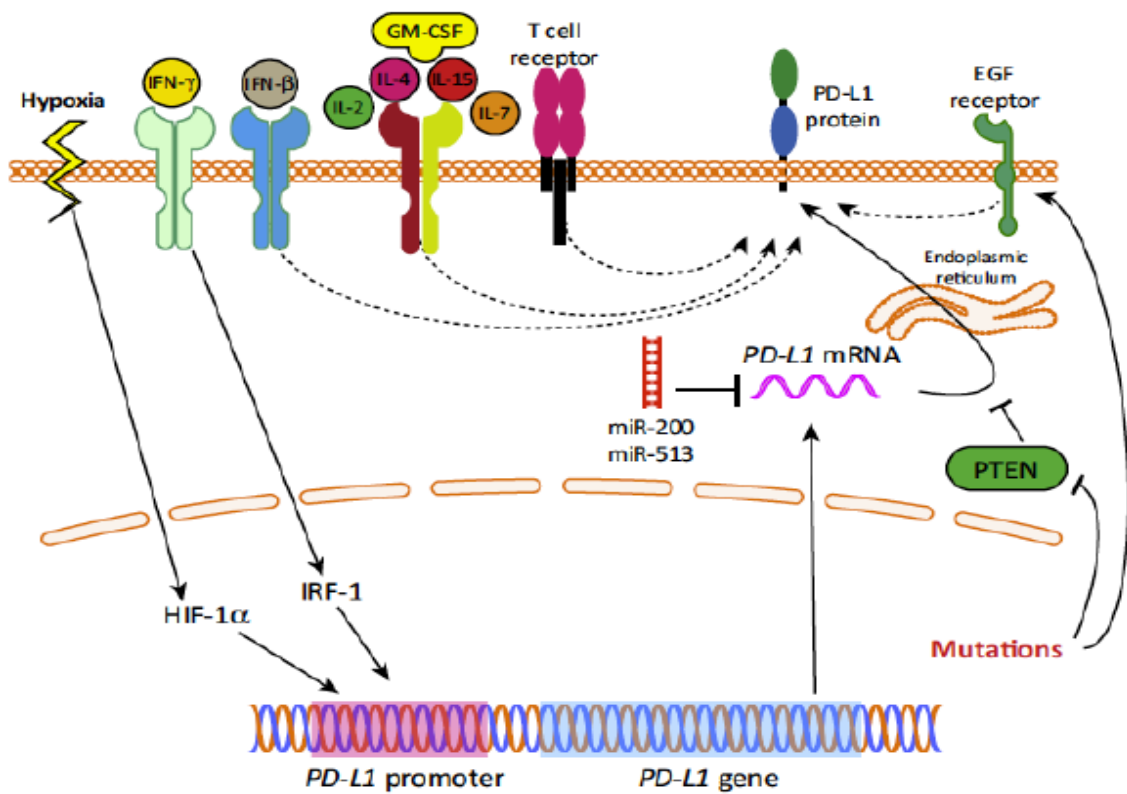
Com a descoberta do ligantes da PD-1 no começo dos anos 2000, PD-L1 (FREEMAN et al. 2000) e PD-L2 (LATCHMAN et al. 2001) sedimentou-se o papel crucial desta proteína na regulação da resposta imune. Sua expressão é geralmente vista nas células apresentadoras de antígeno (APC) do sistema imune, incluindo linfócitos e células dendríticas e pode estar hiperexpresso na superfície das células epiteliais de diversos tumores sólidos.

A expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 é regulada por uma rede complexa de fatores. A expressão de PD-L1 em células T pode ser induzida a nível elevado por diversas citocinas, tais como a IL-2, IL-7, IL-5 e IL-21 (AUSTIN et al. 2014). A expressão de PD-L1 também é regulada por diversas das citocinas pró-inflamatórias, particularmente IFN- γ , representando um mecanismo adaptativo de resistência imunitária exercida pelas células tumorais em resposta à atividade antitumoral endógena (FREEMAN et al. 2000; TAUBE et al. 2012). As Figuras 4 e 5 representam os mecanismos reguladores da expressão de PD-1 e PD-L1 respectivamente.



Fonte: AUSTIN et al. (2014).

Figura 4 - Mecanismos reguladores da expressão de PD-1.



Fonte: AUSTIN et al. (2014).

Figura 5 - Mecanismos reguladores da expressão de PD-L1.

A sinalização PD-L1/PD-1 foi descrita como elemento atenuante da resposta imune a tumores, facilitando o desenvolvimento tumoral (JIN et al. 2011). Descobriu-se que ocorre uma menor ativação de linfócitos T, ou seja, uma diminuição da resposta imune (*down regulation*) quando a PD-1 presente em sua membrana celular se une aos seus ligantes PD-L1 e PD-L2, presentes nas membranas de células tumorais ou apresentadoras de antígenos, suprimindo a sinalização das vias PI3K e AKT (CARTER et al. 2002). Desde então a ideia de que o aumento da expressão de PD-L1 possa ser um mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro pelas células tumorais tem sido alvo de diversos estudos.

Temos, então, que o PD-L1 e o PD-1 formam um sistema complexo de receptores e ligantes envolvidos no controle da ativação de células T. Em tecidos normais, PD-L1 é expresso em células T, células B, células dendríticas, macrófagos, células-tronco mesenquimais, mastócitos e outras células não-hematopoiéticas. PD-L1 também é expresso por tumores, auxiliando os mesmos na evasão de sua detecção e eliminação pelo sistema imune do hospedeiro.

Nos últimos anos cresceu o entendimento do papel do sistema imunológico na carcinogênese de vários tumores. Em 2004 THOMPSON et al. analisaram 196 amostras tumorais de pacientes com carcinoma de células renais e concluíram que os pacientes cujos tumores tinham alta expressão de PD-L1 apresentaram risco 4,5 vezes maior de óbito e tinham doença com comportamento mais agressivo. Em 2007 HAMANISHI et al. descreveram que pacientes com câncer de ovário com expressão elevada

de PD-L1 tiveram sobrevida significativamente menor do que aqueles com baixa expressão e uma redução da contagem de linfócitos T-CD8 (+), sugerindo um papel supressor de células T-CD8 (+) exercido por PD-L1.

1.7.5 PD-L1 e Câncer de Pênis

Em relação a expressão do PD-L1 no CaPe, pouco ainda tem sido reportado. Entretanto, os resultados se mostram animadores. Em 2016 a expressão de PD-L1 no carcinoma epidermóide do pênis foi relatada em três estudos: no primeiro, UDAGER et al. (2016) encontrou 23 dos 37 tumores primários (62,2%) positivos para a expressão de PD-L1. Além disso, a expressão de tumores primários da PD-L1 foi forte correlação positiva com a histologia do tipo usual, metástase linfonodal regional e diminuição da sobrevida específica do câncer (UDAGER et al. 2016); no segundo, OTTENHOF et al. (2017) avaliou a expressão de PD-L1 em 200 espécimes de tumor de uma coorte europeia e obteve que a PD-L1 foi expressa em 96(48%) carcinomas penianos primários; no terceiro, COCKS et al. (2017) revelou, em uma coorte norte-americana, que 21(40%) dos 53 carcinomas epidermóides do pênis tinham expressão PD-L1 positiva, que foi expressa por uma proporção significativa de câncer peniano avançado.

Em estudo publicado em 2017, GU et al. destacam que a frequente superexpressão de PD-L1 nos carcinomas epidermóides de pênis avançado alerta para uma potencial eficácia dos inibidores de PD-1 no tratamento desta neoplasia.

1.8 JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO

Recentemente, as terapias alvo-específicas têm demonstrado promissora atividade antitumoral em vários tipos de câncer. No entanto, é essencial que ocorram pesquisas a fim de elucidar as vias moleculares envolvidas na patogênese de CaPe (GOU et al. 2013). A identificação de alvos moleculares, para a introdução das terapias moleculares tais como os anticorpos monoclonais e os inibidores de tirosina-quinase, pode melhorar o prognóstico pobre e substituir quimioterapias sistêmicas não direcionadas por terapias alvo-específicas menos tóxicas (HEIDENREICH et al. 2008). O CaPe tem muitas semelhanças com outros carcinomas de células escamosas (CCE), por exemplo, CEC de cabeça e pescoço, esofágico e colo do útero (PROTZEL e SPIESS 2013). A inflamação crônica parece ser uma via importante de carcinogênese no CaPe e ele compartilha a ativação de COX-2, PGE2 e EGFR com a maioria dos outros fenótipos de tumores CCE (GOLIJANIN et al. 2004). Este fato cria oportunidades únicas para uma melhor compreensão e tratamento do câncer peniano.

A fim de contribuir para decifrar o repertório de alterações somáticas do câncer peniano, propomos aqui uma abordagem visando demonstrar a expressão de PD-L1 em uma variedade de linhas de células tumorais e sua associação com prognóstico e sobrevida.

O potencial desta abordagem também reside na possibilidade de elucidar potenciais alvos de tratamento com terapias dirigidas às alterações encontradas, sejam elas já disponíveis, em desenvolvimento ou ainda por

serem descobertas contribuindo para melhor compreensão da etiopatogenia molecular e vias de controle do câncer peniano identificando os mecanismos básicos de estabelecimento e progressão tumoral.

Frente ao exposto, reforça-se a importância da avaliação da expressão de PD-L1 em neoplasias humanas, especialmente CaPe, uma vez que a detecção dessa proteína funciona como biomarcador analítico de resposta à terapia anti-PD-1.

Estes exemplos deixam claro que a identificação da ativação de oncogenes em pacientes portadores de carcinoma peniano abre novas possibilidades de tratamento que, de acordo com a molécula alvo identificada e a existência de droga específica, permitem beneficiar os pacientes em curto prazo de tempo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Estabelecer a frequência da expressão da proteína PD-L1 nas células tumorais e nas células T nos CaPe.

2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIOS

- Caracterizar o perfil epidemiológico e clínico-patológico dos pacientes com carcinoma de pênis do estudo;
- Correlacionar a expressão proteica do PD-L1 nas células tumorais, células T, CD4 e CD8 com variáveis clínico-patológicas e dados epidemiológicos coletados dos pacientes;
- Verificar o papel prognóstico da expressão do PD-L1.

3 MATERIAL E METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

O projeto em questão trata-se de um estudo retrospectivo, transversal, clínico-patológico e imunoistoquímico de CaPe em pacientes tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC).

Este estudo faz parte do projeto âncora “Perfil clínico-patológico, molecular e viral do câncer de pênis em pacientes atendidos em um Centro de referência em oncologia do Nordeste brasileiro”, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima.

Foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará em 19/01/2018 (Anexo 1).

Número do Parecer - Plataforma Brasil: 2.470.147

CAAE – 18242113.0.0000.5528

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

Foram incluídas e analisadas no estudo peças cirúrgicas devidamente identificadas de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis que realizaram tratamento cirúrgico do tumor primário no Hospital Haroldo

Juaçaba submetidos, ou não, a linfadenectomia regional, uni ou bilateral, no período de 2002 a 2014.

Dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos além de dados referentes ao tratamento foram coletados em fichas (em anexo) a partir de revisão de prontuários.

3.3 LOCAL E PERÍODO

O estudo foi realizado em dois locais: a coleta de dados nos prontuários foi realizada nas dependências da Escola Cearense de Oncologia (ECO) e a análise imunoistoquímica no Laboratório de Anatomia patológica da Rede D'Or. O período de coleta de dados foi 01 de março de 2015 a dezembro de 2017.

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS PACIENTES

Todos os pacientes com tumor de pênis acompanhados no Serviço de Urologia do HHJ/ICC no período da pesquisa foram considerados um caso dentro da casuística.

Foram considerados critérios de inclusão para o estudo imunoistoquímico: pacientes com diagnóstico de carcinoma do pênis, submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário e a linfadenectomia regional, uni ou bilateral em qualquer momento do seu seguimento;

pacientes sem linfadectomia com seguimento adequado por pelo menos 5 anos (dado já evidenciado na literatura com tempo adequado para assegurar a não existência de metástases); presença de material, arquivado e identificado, suficiente para novos cortes histológicos e estudo imunoistoquímico sem que haja prejuízo do material restante ou esgotamento do bloco de parafina que compunham o exame do paciente.

Os critérios de exclusão para análise biomolecular e imunoistoquímica foram: não localização dos blocos de parafina, ausência de representatividade do tumor no bloco de parafina. Também foram excluídos os pacientes em que não haviam informações suficientemente documentadas nos prontuários para coleta dos dados clínico-epidemiológicos.

3.5 INSTRUMENTO

Utilizou-se, para a coleta de dados, formulário construídos pelos pesquisadores, constituído por uma série ordenada de questões estruturadas (Anexo 1).

Os dados foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes na instituição onde foi realizado o acompanhamento ambulatorial ou hospitalar e levantamento de cadastros no Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) do Ceará, em conformidade com a Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O). Ratifico que o estudo foi aprovado pelo

Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará – ICC, dando liberdade ao pesquisador ter acesso aos dados.

3.6 DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

3.6.1 Idade

Distribuiu-se em duas classes: os que tinham idade menor ou igual a média do grupo e os com idade maior que a média do grupo.

3.6.2 Procedência

Distribuiu-se em duas classes: os que residiam na Capital e os oriundos do interior do Estado.

3.6.3 Etnia

Coletou-se, conforme formulário, a distribuição em quatro grupos: brancos, negros, pardos e indígenas. No entanto para a descrição agrupou-se em duas categorias: brancos e não-brancos. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.4 Fimose

Os pacientes foram devidamente alocados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de fimose já à admissão. Aqueles em que não

se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”

3.6.5 Estado Civil

Os pacientes foram devidamente alocados em cinco grupos: solteiro, casado, separado, viúvo e outros. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.6 Tipo De Cirurgia

Os pacientes foram devidamente alocados em seis grupos de acordo com o tipo de cirurgia realizada: amputação parcial, amputação total, exérese da lesão, postectomia ampliada, emasculação e outras. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.7 Estadiamento

Os pacientes foram devidamente estadiados em: pT1, pT2, pT3, pT4, pN0, pN1, pN2, pN3, M0 e M1 de acordo com a normatização da Union for International Cancer Control (UICC). Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.8 Esvaziamento Linfonodal

Os pacientes foram devidamente alocados em seis grupos de acordo com a abordagem linfonodal: não realizada, inguinal, inguino-ilíaco, linfonodo

sentinela, pélvica e pélvica extendida. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.9 Localização Do Tumor

Os pacientes foram devidamente alocados em cinco grupos de acordo com a localização do tumor em: glande, base, haste, prepúcio e sulco balanoprepucial. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.10 Tamanho do Tumor

Os pacientes foram devidamente alocados em três grupos: até 1 cm, de 1,01cm a 5 cm e maior que 5 cm. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.11 Diferenciação Histológica

Os pacientes foram devidamente alocados em sete grupos de acordo com a classificação histológica: usual, basalóide, condilomatoso, Verrucoso, papilífero, sarcomatoide e pseudohiperplasico. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.12 Grau Histológico

Os pacientes foram devidamente alocados em três grupos de acordo com o grau histológico do tumor em: bem diferenciado, moderadamente

diferenciado e pouco diferenciado. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.13 Invasão Vascular

Os pacientes foram devidamente alocados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de invasão vascular. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.14 Invasão Uretra

Os pacientes foram devidamente alocados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de invasão da uretra. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.15 Invasão Neural

Os pacientes foram devidamente alocados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de invasão neural. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.16 Invasão de Órgãos Adjacentes

Os pacientes foram devidamente alocados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de invasão a órgãos adjacentes. Aqueles em

que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.17 Recidiva

Os pacientes foram devidamente alocados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de recidiva. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “não referido”.

3.6.18 Estado Final

Quanto ao “*status*” final dos pacientes agrupamo-los em três categorias: vivos sem doença (VSD); vivos com doença (VCD) e pacientes em situação de óbito. Aqueles em que não se pôde obter tal informação do prontuário médico foram classificados no grupo “perdidos de vista”.

3.6.19 Expressão da Proteína PD-L1 nas Células Tumorais

Quanto à expressão de PD-L1 nas células tumorais, foram considerados POSITIVOS os casos em que houve mais de 10% de marcações na imunohistoquímica. Os casos em que não houve marcação foram considerados NEGATIVOS e os nos quais não se pode fazer tal avaliação foram considerados INCONCLUSIVOS.

3.6.20 Expressão da Proteína PD-L1 nas Células Inflamatórias Infiltrantes do Tumor (TILs)

Quanto à expressão de PD-L1 nas células inflamatórias infiltrantes do tumor, foram considerados +(POSITIVOS UMA CRUZ), os casos em que houve menos de 5% de células marcadas; ++(POSITIVOS DUAS CRUZES), os casos com mais de 5% de marcações na imunohistoquímica. Os casos em que não houve marcação foram considerados NEGATIVOS e os nos quais não se pode fazer tal avaliação foram considerados INCONCLUSIVOS.

3.6.21 Expressão da Proteína PD-L1 em CD4

Quanto à expressão de PD-L1 nas células CD4, foram considerados +(POSITIVOS UMA CRUZ), os casos em que houve menos de 5% de células marcadas; ++(POSITIVOS DUAS CRUZES), os casos com mais de 5% de marcações na imunohistoquímica. Os casos em que não houve marcação foram considerados NEGATIVOS e os nos quais não se pode fazer tal avaliação foram considerados INCONCLUSIVOS.

3.6.22 Expressão da Proteína PD-L1 em CD8

Quanto à expressão de PD-L1 nas células CD8, foram considerados +(POSITIVOS UMA CRUZ), os casos em que houve menos de 5% de células marcadas; ++(POSITIVOS DUAS CRUZES), os casos com mais de 5% de marcações na imunohistoquímica. Os casos em que não houve marcação foram considerados NEGATIVOS e os nos quais não se pode fazer tal avaliação foram considerados INCONCLUSIVOS.

3.7 CONSTRUÇÃO DO TMA

Após a provação do CEP para início da pesquisa os blocos de tumor foram devidamente separados para o estudo. O *Tissue microarray* (TMA) é um método de preparação de um novo bloco de parafina, e consiste em retirar parte de um tecido que foi preparado em um bloco de parafina convencional (bloco doador) e colocá-lo em um novo bloco (bloco receptor). Esse processo nos permite colocar amostras de vários doadores em uma única lâmina, com isso torna-se possível corar os preparos uniformemente com métodos imunohistoquímicos sendo útil por permitir a análise de um grande número de amostras rapidamente. Assim sendo, cilindros de 1,0 mm da área tumoral foram transferidos em duplicata para o bloco receptor com posição bidimensional separados por espaços de 0,2 mm, determinados e gravados pelo equipamento. Deste novo bloco, foram obtidos cortes histológicos realizados com micrótomo manual e transferidos para lâminas eletricamente carregadas.



Figura 6 - Foto do Aparelho de TMA utilizado no nosso estudo. Modelo: MTA-I. Marca: *Beecher Instruments*.

Toda a metodologia para construção dos blocos foi realizada nas dependências do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital São Luiz da Rede D'Or sede Jabaquara em São Paulo.

3.8 CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUIMICA

O anticorpo monoclonal 22C3 (DAKO) é destinado a uso laboratorial para detecção imuno-histoquímica da proteína PD-L1 em tecido fixado em formalina e incluído em parafina (bloco de parafina); para a detecção de CD4 foi utilizado o anticorpo SP35 (Roche) e para CD8 o anticorpo SP57 (Roche).

Cortes histológicos dos blocos parafina foram submetidos à análise por imuno-histoquímica utilizando a plataforma de imunocoloração automatizada VENTANA BenchMark ULTRA seguindo-se estritamente o protocolo do fabricante, acompanhado pelo kit de detecção VENTANA OptiView DAB IHC e outros acessórios.

A interpretação foi realizada exclusivamente pelo Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, patologista qualificado, em conjunto com o exame histopatológico, informações clínicas relevantes e controles apropriados.

Esse anticorpo produz coloração de membrana completa ou basolateral de qualquer intensidade. Uma segunda lâmina foi corada com Ig de controle negativo monoclonal de coelho, auxiliando na avaliação da coloração de fundo.

O resultado da expressão de PD-L1 foi determinado pela porcentagem de células tumorais (TC) com imunocoloração de membrana (completa ou basolateral) de qualquer intensidade e/ou pela porcentagem de células imunes associadas ao tumor (IC) com imunocoloração de qualquer intensidade.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações foram digitadas em planilhas eletrônicas no software *MICROSOFT EXCEL*® para Mac versão 16.20 2018 para criação do banco de dados do estudo. Os dados foram tabulados, armazenados e

processados através do programa estatístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS®) Versão 22.0 para Windows.

Análises descritivas dos dados foram realizadas utilizando-se frequências absolutas e relativas, médias e/ou medianas. Para análise das variáveis independentes foi utilizado o teste de associação do qui-quadrado. Quando alguma casela apresentou valor esperado menor ou igual a cinco, utilizou-se o teste exato de Fisher. Assumiu-se um nível de significância de 5% para em todas as análises estatísticas. Quando variáveis apresentaram associação significativa com PDL1, CD4, CD8 e perfil inflamatório, elas foram inseridas em modelo de regressão logística multinomial (análise multivariada), sendo expressas suas odds ratio ajustadas e respectivos intervalos de confiança 95%.

Para avaliar a sobrevida dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis, fez-se uso da curva de Kaplan-Meier. A sobrevida global foi calculada a partir da data do início do tratamento até a última consulta ou data do óbito. A influência das variáveis na sobrevida foi analisada utilizando-se o teste "Log-Rank".

4 RESULTADOS

Os pacientes com neoplasia de pênis atendidos no ICC no período considerado desta pesquisa totalizaram 116, entretanto com 32 destes não foi possível construir o TMA e nem fazer imunoistoquímica devido ao cumprimento dos critérios de permanência, tendo eles sido excluídos do estudo. Nossa amostra contou, então, com 84 pacientes.

4.1 DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

4.1.1 Distribuição quanto à Idade

A média de idade dentre os pacientes incluídos no estudo foi de 67,6 anos, sendo o paciente mais jovem com 35 anos e o mais velho com 104 anos. Cerca de 51,2% dos pacientes apresentaram-se com idade menor ou igual a média. A Figura 7 representa o histograma com a curva normal.

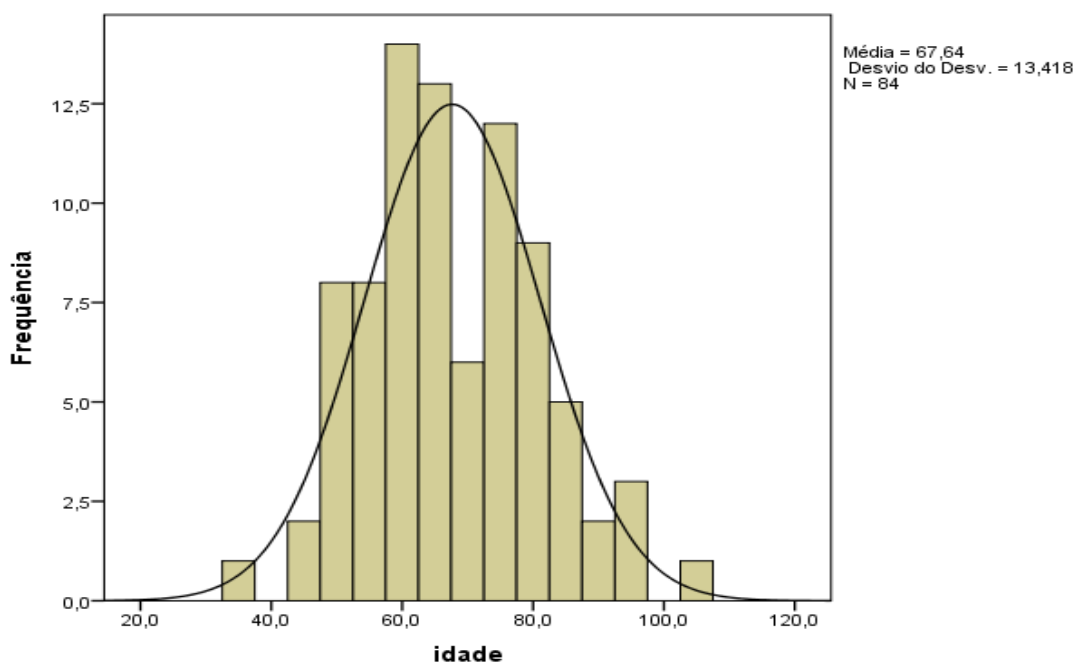


Figura 7 - Histograma das idades dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

4.1.2 Distribuição quanto à Procedência

Mais de 65% dos pacientes foram provenientes de cidades do interior do Estado do Ceará (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a procedência.

Procedência	Frequência	Percentual
Capital	29	34,5
Interior	55	65,5
Total	84	100,0

4.1.3 Distribuição quanto ao Estado Civil

Quanto ao estado civil 68,7% dos pacientes afirmaram ser casados com vínculo afetivo fixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao estado civil.

Estado civil	Frequência	Percentual
Solteiro	9	10,7
Casado	57	68,7
Divorciado	5	6,0
Outros	4	3,8
Viúvo	9	10,8
Total	84	100,0

4.1.4 Distribuição quanto à Etnia

Em relação a etnia, a maioria dos pacientes (72,6%) foi agrupada como “não-brancos” (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto à etnia.

Etnia	Frequência	Percentual
Branco	22	26,2
Não-Branco	61	72,6
Não referido	1	1,2
Total	84	100,0

4.1.5 Distribuição quanto ao tipo de Cirurgia

Mais de 82% dos pacientes foram submetidos a amputação parcial e apenas 2,4% necessitaram de emasculação (Figura 8).

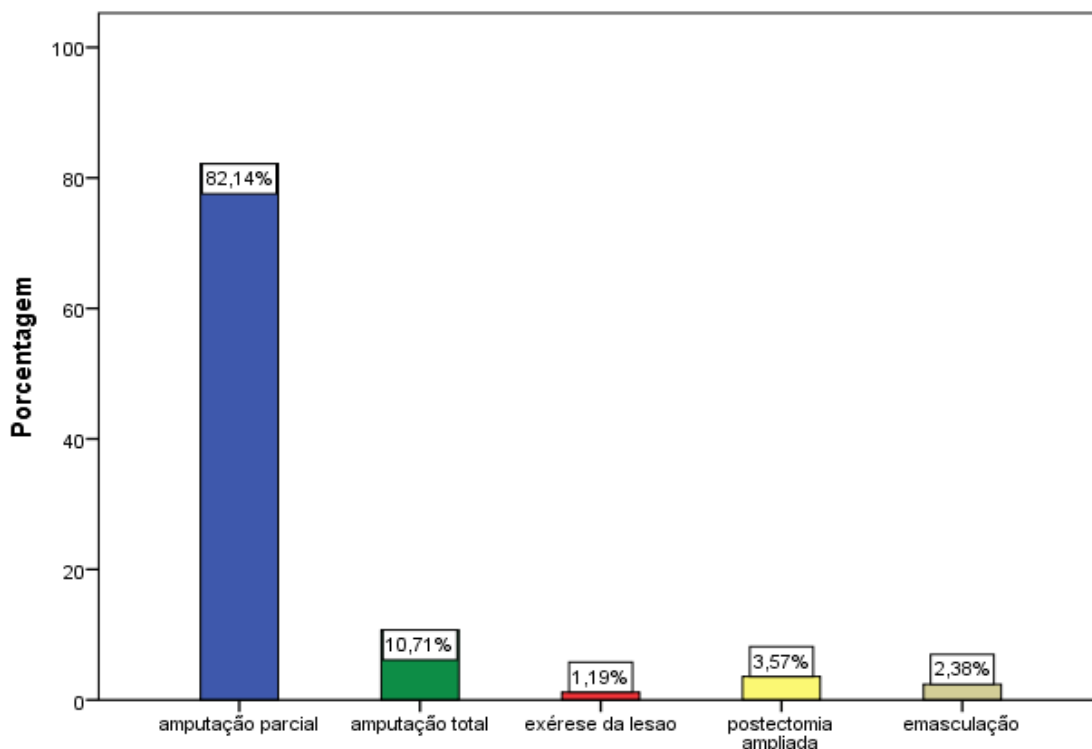


Figura 8 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao tipo de cirurgia realizada.

4.1.6 Distribuição quanto ao Esvaziamento Linfonodal

Em cerca de 38,1% dos pacientes foi realizado esvaziamento linfonodal, dos quais 15,5% inguinal e 22,6% inguino-ilíaco. Em cerca de 4,8% foi realizada pesquisa de linfonodo sentinela (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a realização de esvaziamento linfonodal.

Esvaziamento Linfonodal	Frequência	Percentual
Não	45	53,6
Inguinal	13	15,5
inguino-ilíaco	19	22,6
Linfonodo sentinela	4	4,8
Não referido	3	3,6
Total	84	100,0

4.1.7 Distribuição quanto á Localização do Tumor

A localização mais comum foi a glândula (88,1%), seguida pelo prepúcio (27,4%) e o sulco balanoprepucial (26,2%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a localização do tumor.

Localização do Tumor	Frequência	Percentual
Glande		
Não	9	10,7
Sim	74	88,1
Não referido	1	1,2
Total	84	100,0
Base		
Não	81	96,4
Sim	2	2,4
Não referido	1	1,2
Total	84	100,0
Haste		
Não	78	92,9
Sim	5	6,0
Não referido	1	1,2
Total	84	100,0
Prepúcio		
Não	60	71,4
Sim	23	27,4
Não referido	1	1,2
Total	84	100,0
Sulco balanoprepucial		
Não	61	72,6
Sim	22	26,2
Não referido	1	1,2
Total	84	100,0

4.1.8 Distribuição quanto ao Tamanho do Tumor

Quanto ao tamanho, a maioria absoluta dos tumores (72,6%) estava entre 1,01cm e 5,0cm (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao tamanho do tumor.

Tamanho do tumor	Frequência	Percentual
Até 1,0 cm	4	4,8
1,01cm a 5,0 cm	61	72,6
Maior que 5,0 cm	15	17,9
Não referido	4	4,7
Total	84	100,0

4.1.9 Distribuição quanto ao Estadiamento Patológico - pT

Quanto ao estadiamento patológico dos tumores 26 pacientes se apresentaram como pT1 (31%); 33 como pT2 (39,3%); 21 como pT3 (25%) e 1 como pT4 (1,2%). Em 3 prontuários tal informação não foi encontrada (Figura 9).

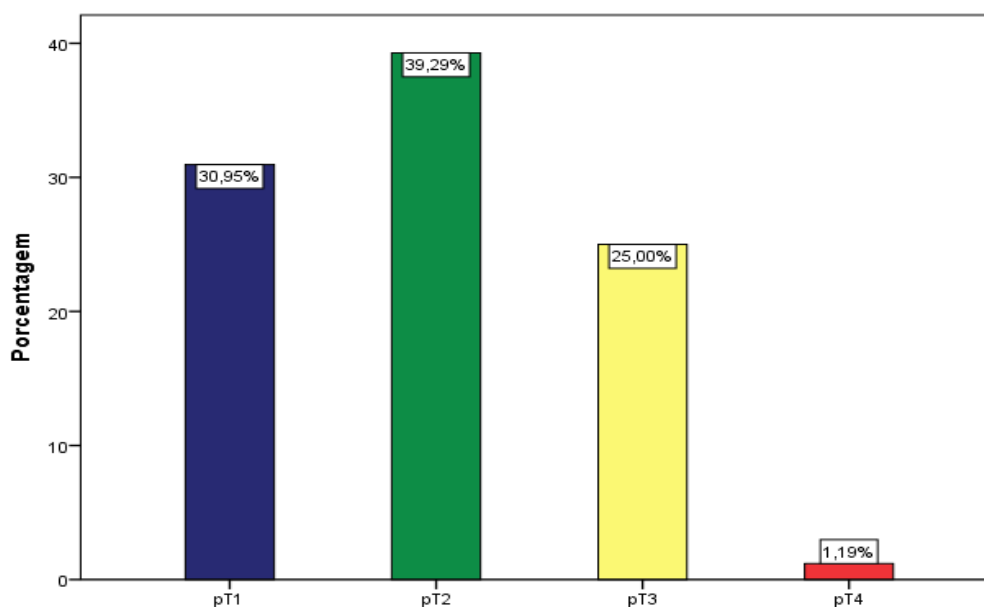


Figura 9 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao estágio patológico.

4.1.10 Distribuição quanto ao Estadiamento Patológico - pN

Dentre os pacientes nos quais foi avaliado o acometimento linfonodal 19% não apresentaram neoplasia (estádio pN0), 4,8% eram pN1 e 16,7% pN3 (Figura 10).

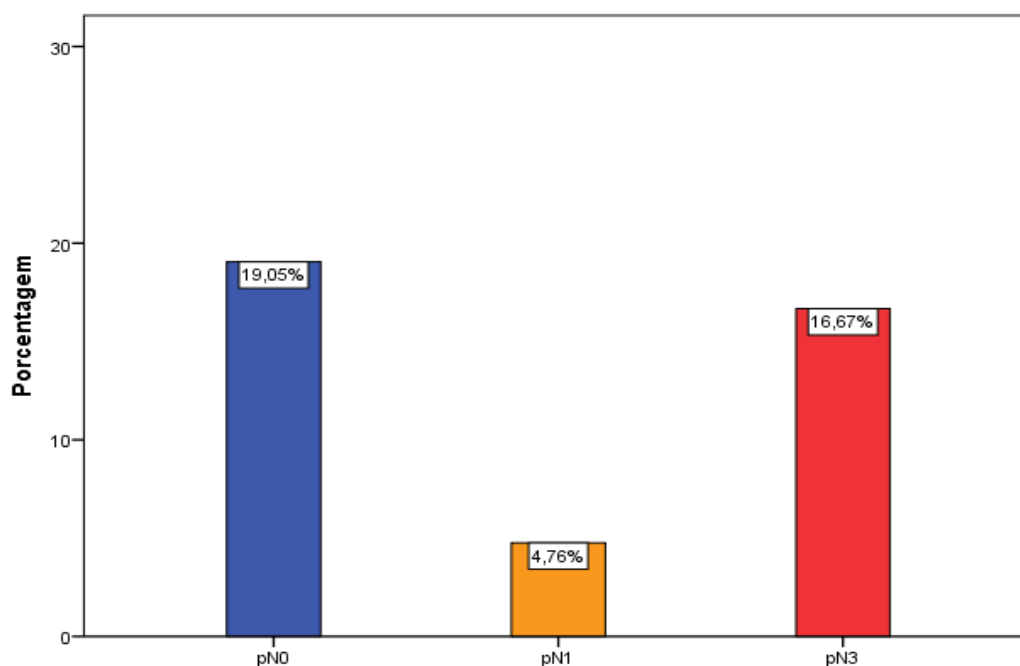


Figura 10 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao envolvimento linfonodal.

4.1.11 Distribuição quanto à Diferenciação Histológica

Com relação a diferenciação dos carcinomas epidermóides estudados, o subtipo histológico usual foi o mais frequente (67,9%) seguido pelo condilomatoso (17,9%) (Figura 11).

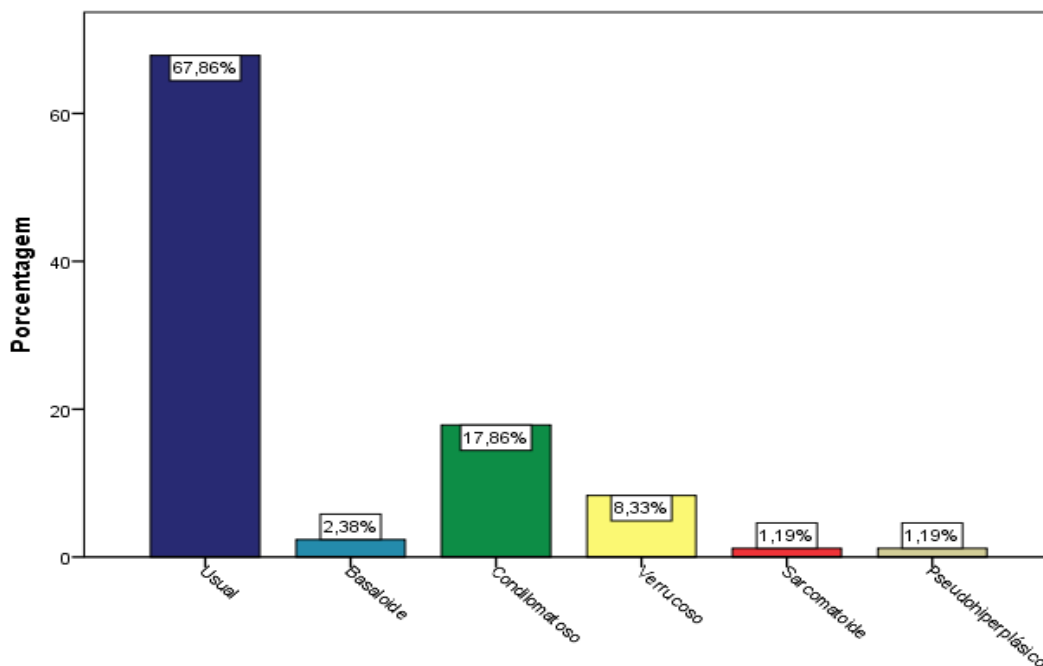


Figura 11 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a diferenciação histológica.

4.1.12 Distribuição quanto ao Grau Histológico

Quanto ao grau de diferenciação da neoplasia, 61,9% dos tumores mostrou-se com grau histológico moderadamente diferenciado (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao grau histológico.

Grau de Diferenciação	Frequência	Percentual
Bem diferenciado	27	32,1
Moderadamente diferenciado	52	61,9
Pouco diferenciado	5	6,0
Total	84	100,0

4.1.13 Distribuição quanto á Presença de Invasão Vascular

Em cerca de 58,3% dos tumores não houve invasão vascular (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão vascular.

Invasão Vascular	Frequência	Percentual
Não	49	58,3
Sim	34	40,5
Não referido	1	1,2
Total	84	100,0

4.1.14 Distribuição quanto á Presença de Invasão da Uretra

Dentre os tumores analisados 14,3% invadiam a uretra (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão da uretra.

Invasão da Uretra	Frequência	Percentual
Não	44	52,4
Sim	12	14,3
Não referido	28	33,3
Total	84	100,0

4.1.15 Distribuição quanto á Presença de Invasão Neural

Em 36,9% dos casos houve invasão neural (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão neural.

Invasão Neural	Frequência	Percentual
Não	53	63,1
Sim	31	36,9
Total	84	100,0

4.1.16 Distribuição quanto á Presença de Invasão em Órgãos Adjacentes

Mais de 65% não invadiam órgãos adjacentes (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a invasão de órgãos adjacentes.

Invasão de Órgãos Adjacentes	Frequência	Percentual
Não	55	65,5
Sim	1	1,2
Não referido	28	33,3
Total	84	100,0

4.1.17 Distribuição quanto á Presença de Recidiva

Cerca de 73,8% dos pacientes não tiveram recidiva do tumor (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a recidiva do tumor.

Recidiva	Frequência	Percentual
Não	62	73,8
Sim	18	21,4
Não referido	4	4,8
Total	84	100,0

4.1.18 Distribuição quanto ao Status Final

Mais de 64% dos pacientes estavam vivos e livre da doença ao final deste seguimento e pouco mais de 4% evoluíram para óbito. Cerca de 15% dos pacientes perderam o seguimento (Figura 12).

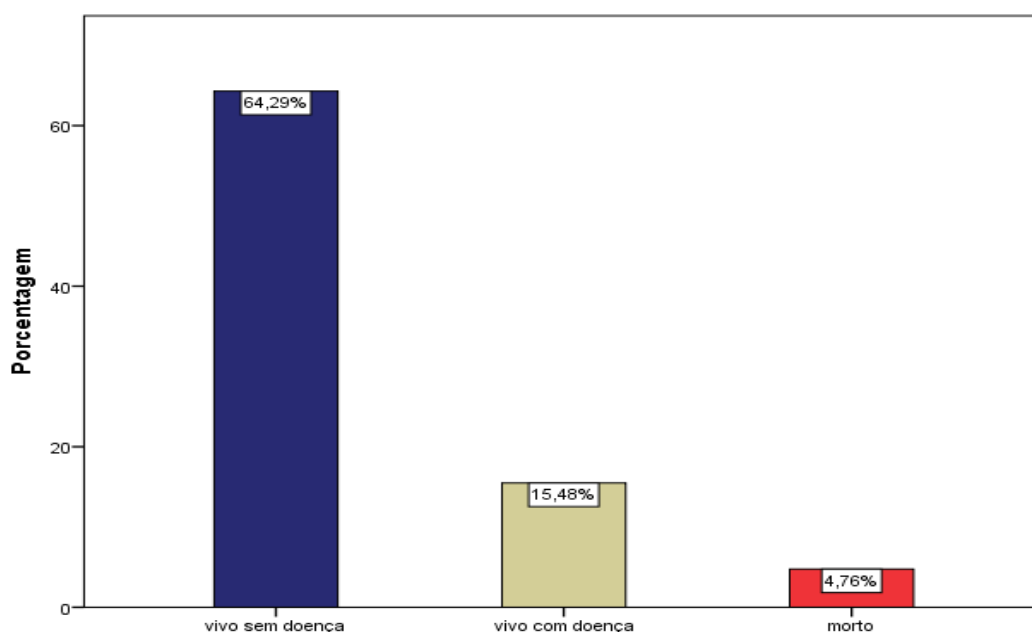


Figura 12 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto ao status final.

4.2 DESCRIÇÃO DOS DADOS DA IMUNOISTOQUIMICA

4.2.1 Expressão de PD-L1 nas células tumorais

Mais de 22% foram positivos para a expressão de PD-L1 (Tabela 13 e Figura 13).

Tabela 13 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas células tumorais.

Expressão PD-L1 nas células tumorais	Frequência	Porcentagem
Inconclusivo	7	8,3
Negativo	58	69,0
Positivo	19	22,6
Total	84	100,0

4.2.2 Expressão de PD-L1 nas Células Inflamatórias

Em mais de 52% houve expressão de PD-L1 em células inflamatórias infiltrantes de tumor, sendo que em 36,9% houve menos de 5% das células marcadas e em 15,5% mais de 5% (Tabela 14 e Figura 14).

Tabela 14 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas Células Inflamatórias Infiltrantes de Tumor.

Expressão de PD-L1 nas Células Inflamatórias	Frequência	Porcentagem
Menos 5%	31	36,9
Mais de 5%	13	15,5
Inconclusivo	8	9,5
Negativo	32	38,1
Total	84	100,0

4.2.3 Expressão de PD-L1 nas células CD4

Em mais de 56% houve expressão de PD-L1 em CD4, sendo que em 28,6% houve menos de 5% das células marcadas e em 27,4% mais de 5% (Tabela 15 e Figura 15).

Tabela 15 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas células CD4.

Expressão de PD-L1 nas células CD4	Frequência	Porcentagem
Menos 5%	24	28,6
Mais de 5%	23	27,4
Inconclusivo	8	9,5
Negativo	29	34,5
Total	84	100,0

4.2.4 Expressão de PD-L1 nas células CD8

Em mais de 70% houve expressão de CD8, sendo que em 28,6% houve menos de 5% das células marcadas e em 41,7% mais de 5% (Tabela 16 e Figura 16).

Tabela 16 - Distribuição dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014, quanto a expressão de PD-L1 nas células CD8.

Expressão de PD-L1 nas células CD8	Frequência	Porcentagem
Menos 5%	24	28,6
Mais de 5%	35	41,7
Inconclusivo	7	8,3
Negativo	18	21,4
Total	84	100,0

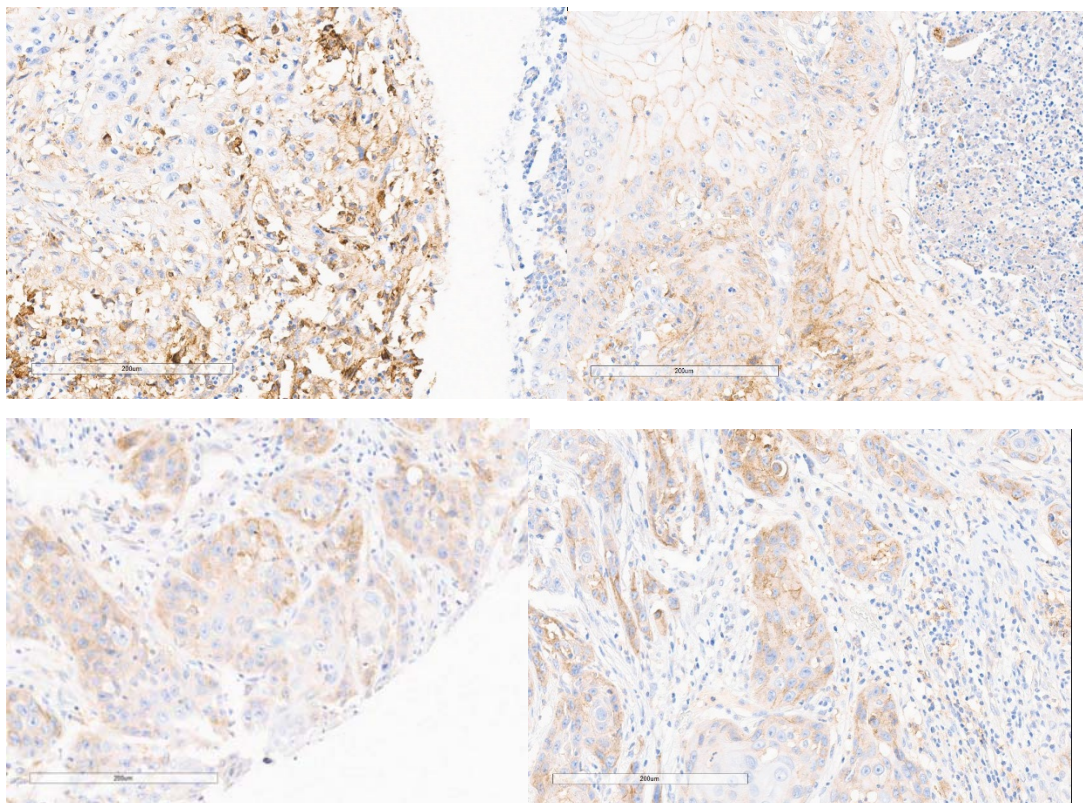


Figura 13 - Expressão de PD-L1 em células tumorais.

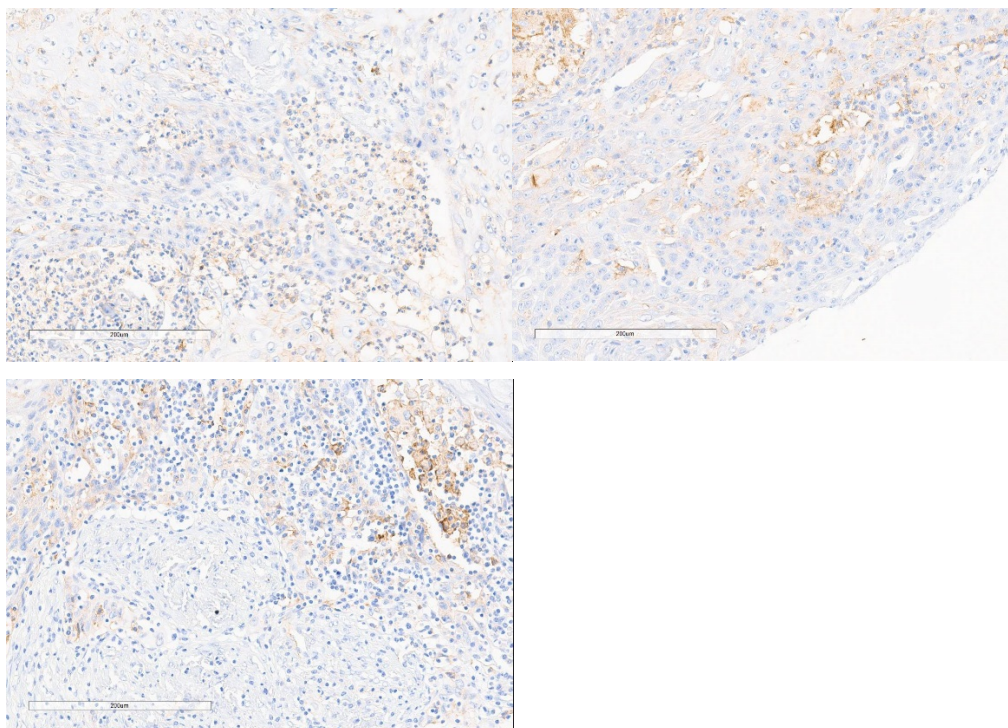


Figura 14 - Expressão de PD-L1 em células inflamatórias.

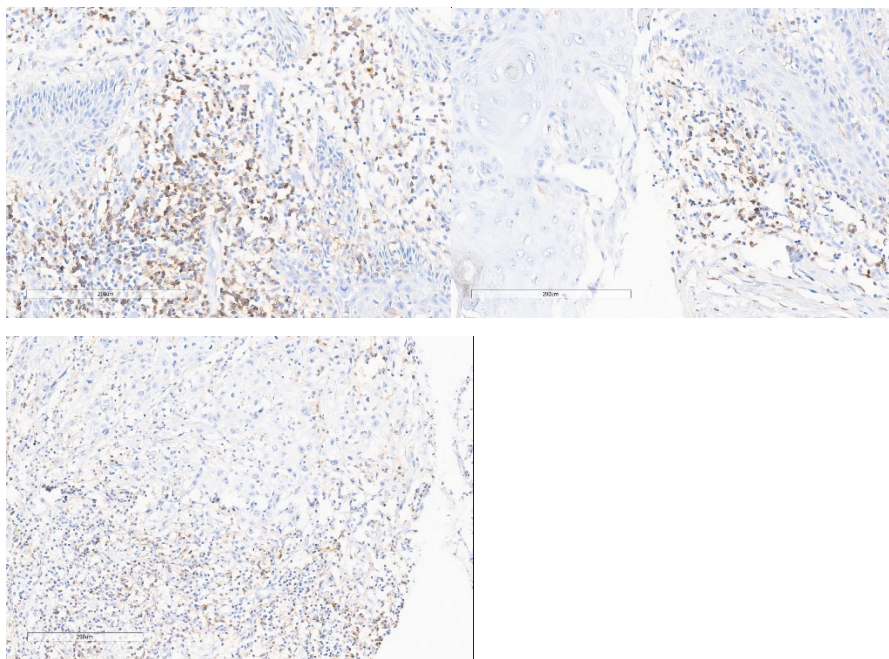


Figura 15 - Expressão de PD-L1 em células CD4.

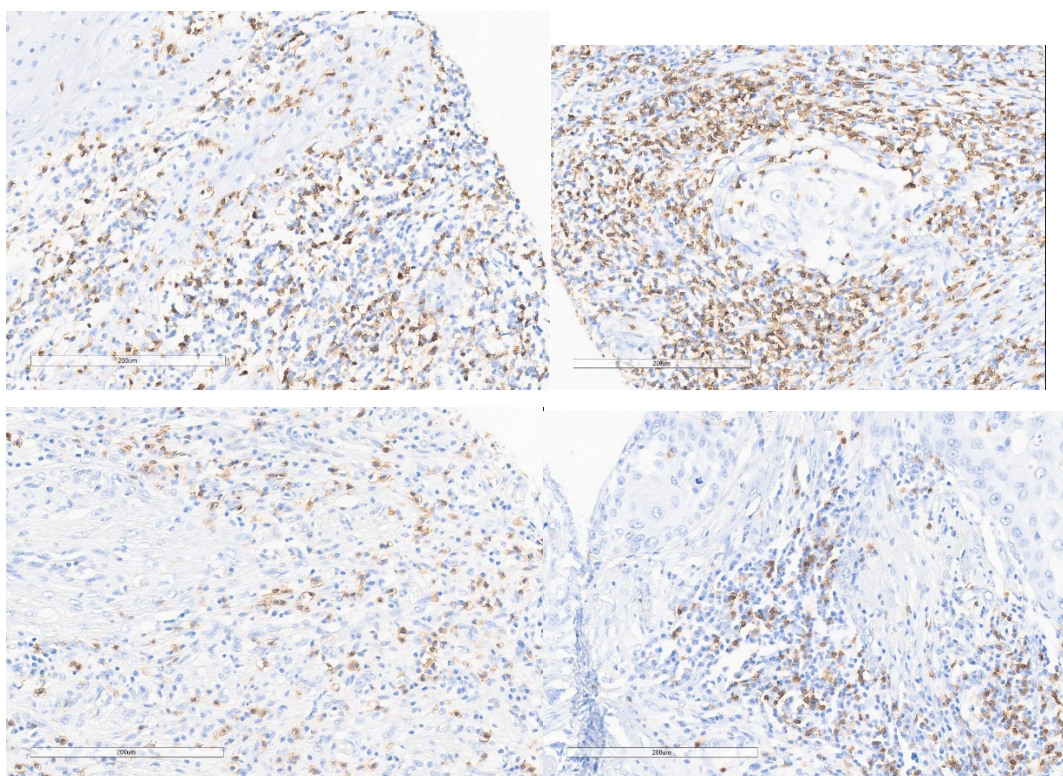


Figura 16 - Expressão de PD-L1 em células CD8.

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.3.1 Análise Univariada

A Tabela 17 mostra a influência da expressão da variável dependente “expressão de PD-L1 em células tumorais” sobre as demais variáveis. Houve significância estatística para a associação entre a expressão de PD-L1 em células tumorais com expressão de PD-L1 em Células Inflamatórias ($p=0,000$), CD4 ($p=0,001$), CD8 ($p=0,012$) e estágio pT ($p=0,02$).

Tabela 17 - Associação entre a expressão de PD-L1 em células tumorais e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

	Expressão de PD-L1 em Células tumorais		P-Valor
	Negativo	Positivo	
Expressão de PD-L1 em Células Inflamatórias			
Negativo	31	1	0,000
Menos 5%	26	5	
Mais 5%	0	13	
Expressão de PD-L1 em CD4			
Negativo	27	2	0,001
Menos 5%	19	5	
Mais 5%	11	12	
Expressão de PD-L1 em CD8			
Negativo	17	1	0,012
Menos 5%	20	4	
Mais 5%	21	14	
IDADE			
Menor ou Igual a média	29	10	0,842
Acima da média	29	9	
Etnia			
Branco	12	8	0,071
Não-Branco	45	11	
Estádio T			
pT1	22	2	0,02
pT2/3/4	34	17	
Acometimento Linfonodal			
LN-	43	14	0,931
LN+	13	4	

Cont/ Tabela 17

	Expressão de PD-L1 em Células tumorais		P-Valor
	Negativo	Positivo	
TAMANHO TUMOR			
Até 5 cm	48	13	0,095
>5 cm	8	6	
Grau Histológico			
Bem diferenciado	20	5	0,274
Moderadamente diferenciado	33	14	
Pouco diferenciado	5	0	
Diferenciação Histológica			
Usual	40	11	0,324
Outros	17	8	
Invasão Vascular			
Não	31	12	0,504
Sim	26	7	
Invasão Neural			
Não	34	12	0,726
Sim	24	7	
Invasão Uretra			
Não	31	8	0,096
Sim	6	5	
Recidiva Tumor			
Não	41	14	0,845
Sim	13	5	
Status Final			
Vivo	46	15	0,973
Óbito	12	4	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson

Tabela 18 - Associação entre a expressão de PD-L1 em Células Inflamatórias e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

	Expressão PD-L1 em Células Inflamatórias		p-Valor
	Negativo	Positivo	
Expressão de PD-L1 CD4			
Negativo	19	10	0,004
Menos 5%	8	16	
Mais 5%	5	18	
Expressão de PD-L1 CD8			
Negativo	15	2	0,000
Menos 5%	12	12	
Mais 5%	5	30	
IDADE			
Menor ou Igual a média	16	23	0,845
Acima da média	16	21	
Etnia			
Branco	7	13	0,502
Não-Branco	24	31	
Estádio T			
pT1	16	7	0,001
pT2/3/4	14	37	
Acometimento Linfonodal			
LN-	27	29	0,071
LN+	4	13	
TAMANHO TUMOR			
Até 5 cm	27	34	0,371
>5 cm	4	9	
Grau Histológico			
Bem diferenciado	15	10	0,039
Moderadamente diferenciado	14	32	
Pouco diferenciado	3	2	
Diferenciação Histológica			
Usual	17	34	0,04
Outros	14	10	
Invasão Vascular			
Não	20	22	0,212
Sim	11	22	
Invasão Neural			
Não	23	22	0,055
Sim	9	22	
Invasão Uretra			
Não	14	25	0,977
Sim	4	7	
Recidiva Tumor			
Não	24	30	0,408
Sim	6	12	
Status Final			
Vivo	25	35	0,881
Óbito	7	9	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson

A Tabela 18 acima mostra a influência da expressão da variável dependente “expressão de PD-L1 em células inflamatórias” sobre as demais variáveis. Para esta análise agrupamos a variável dependente em dois grupos (positivo e negativo). Houve significância estatística para a associação entre a expressão de PD-L1 em Células Inflamatórias com de PD-L1 em CD4 ($p=0,004$), CD8 ($p=0,000$), estágio pT ($p=0,001$), grau histológico ($p=0,03$) e diferenciação histológica ($p=0,04$).

A Tabela 19 abaixo mostra a influência da expressão da variável dependente Expressão de PD-L1 em CD4 sobre as demais variáveis. Houve significância estatística para a associação entre a expressão de PD-L1 em CD4 com CD8 ($p=0,000$) e grau histológico ($p=0,013$).

Tabela 19 - Associação entre a expressão de PD-L1 em CD4 e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

	Expressão de PD-L1 em CD4		p-Valor
	Negativo	Positivo	
Expressão de PD-L1 em CD8			
Negativo	14	3	0,00000
Menos 5%	7	17	
Mais 5%	8	27	
IDADE			
Menor ou Igual a média	14	25	0,677
Acima da média	15	22	
Etnia			
Branco	4	16	0,061
Não-Branco	24	31	
Estádio T			
pT1	10	13	0,401
pT2/3/4	17	34	
Acometimento Linfonodal			
LN-	19	37	0,066
LN+	10	7	

Cont/ Tabela 19

	Expressão de PD-L1 em CD4		p-Valor
	Negativo	Positivo	
TAMANHO TUMOR			
Até 5 cm	24	37	0,563
>5 cm	4	9	
Grau Histológico			
Bem diferenciado	8	17	0,013
Moderadamente diferenciado	16	30	
Pouco diferenciado	5	0	
Diferenciação Histológica			
Usual	19	32	0,984
Outros	9	15	
Invasão Vascular			
Não	13	29	0,197
Sim	15	18	
Invasão Neural			
Não	17	28	0,934
Sim	12	19	
Invasão Uretra			
Não	17	22	0,52
Sim	6	5	
Recidiva Tumor			
Não	20	34	0,888
Sim	7	11	
Status Final			
Vivo	22	38	0,604
Óbito	7	9	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson

A Tabela 20 mostra a influência da expressão da variável dependente “expressão de PD-L1 em CD8” sobre as demais variáveis. Houve significância estatística para a associação entre a expressão de PD-L1 CD8 com estágio pT (p=0,019) e diferenciação histológica (p=0,046).

Tabela 20 - Associação entre a expressão de PD-L1 em CD8 e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014

	Expressão de PD-L1 em CD8		p-Valor
	Negativo	Positivo	
IDADE			
Menor ou Igual a média	7	32	0,254
Acima da média	11	27	
Etnia			
Branco	5	15	0,872
Não-Branco	13	43	
Estádio T			
pT1	9	15	0,019
pT2/3/4	7	44	
Acometimento Linfonodal			
LN-	14	43	0,931
LN+	4	13	
TAMANHO TUMOR			
Até 5 cm	13	48	0,558
>5 cm	4	10	
Grau Histológico			
Bem diferenciado	7	18	0,463
Moderadamente diferenciado	9	38	
Pouco diferenciado	2	3	
Diferenciação Histológica			
Usual	8	43	0,046
Outros	9	16	
Invasão Vascular			
Não	9	34	0,731
Sim	8	25	
Invasão Neural			
Não	12	34	0,494
Sim	6	25	
Invasão Uretra			
Não	10	29	0,913
Sim	3	8	
Recidiva Tumor			
Não	15	40	0,159
Sim	2	16	
Status Final			
Vivo	14	47	0,863
Óbito	4	12	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson

4.3.2 Análise Multivariada

As variáveis com associação significativa à imunexpressão de PDL1 foram inseridas em modelo de regressão logística multinomial (análise multivariada), verificando-se que apenas a presença da expressão de PD-L1 em células inflamatórias associou-se 11,29 (IC95% = 1,25 – 102,31) vezes com a imunomarcção para PD-L1 em células tumorais (Tabela 22). Os casos com expressão de PD-L1 em células inflamatórias positivo mostraram-se independentemente associados a imunomarcção para expressão de PD-L1 em CD8 aumentando em 7,20 (IC95% = 1,15 – 45,17) vezes sua prevalência. A positividade para expressão de PD-L1 em CD4 foi significativamente associada a expressão de PD-L1 em CD8 aumentando em 12,00 (IC95% = 2,85 – 50,65) vezes sua frequência e a positividade para expressão de PD-L1 em CD8 foi independentemente associada aos tumores T2/3/4, com uma força de associação de 3,53 (IC95% = 1,01 – 12,26) vezes (Tabela 21).

Tabela 21 - Associações significantes entre a expressão de PD-L1 em Células Tumorais, Células Inflamatórias, CD4 e CD8 e variáveis clínico-patológicas dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

	p-Valor	OR		
		Ajustada	IC 95%	
PDL1 tumorais				
Inflamatório (positivo)	0,031	11,29	1,25	102,31
CD4 (positivo)	0,073	4,79	0,87	26,46
CD8 (positivo)	0,914	0,86	0,06	12,51
T (2/3/4)	0,226	2,92	0,52	16,51
Inflamatório (positivo)				
CD4 (positivo)	0,124	3,09	0,73	12,95
CD8 (positivo)	0,035	7,20	1,15	45,17
T2/3/4	0,056	3,83	0,97	15,14
Grau histológico (moderadamente)	0,783	1,50	0,08	26,81
Epidermoide (Usual)	0,333	0,53	0,14	1,93
CD4 (positivo)				
CD8 (positivo)	0,001	12,00	2,85	50,65
T2/3/4	0,897	0,92	0,28	3,06
CD8 (positivo)				
T2/3/4	0,047	3,53	1,01	12,26
Epidermoide (Usual)	0,238	0,47	0,14	1,65

*p<0,05, regressão logística multinomial.

4.4 ANÁLISES DE SOBREVIDA

4.4.1 Sobrevida Global

A probabilidade acumulada de sobrevida global dos pacientes foi de 94,9% (Figura 17). A sobrevida média estimada para os pacientes, considerando todas as causas de óbito foi de 142,6 meses (IC = 127,6 a 157,6).

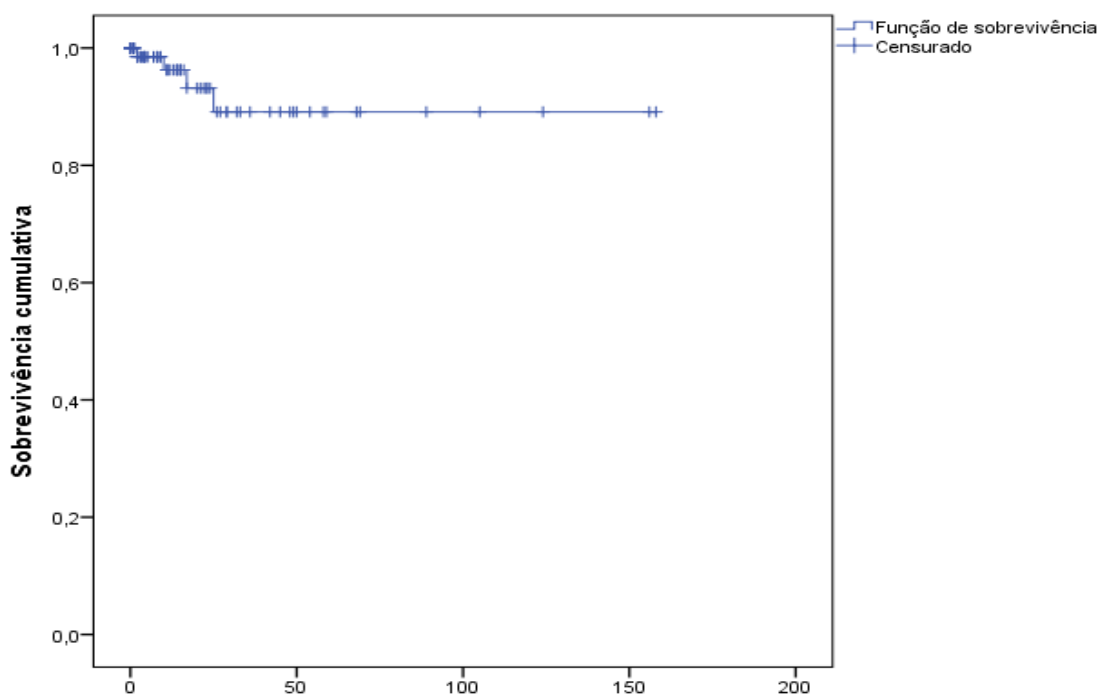


Figura 17 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida global dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

4.4.2 Sobrevida Global de acordo com a Recidiva

A probabilidade acumulada de sobrevida foi de 90,0%, para os pacientes que não apresentaram recidiva e 66,7% para os que apresentaram, conforme visto na Figura 18.

A sobrevida média estimada foi de 131,12 meses (IC = 110,5 a 151,7) para os pacientes que não apresentaram recidiva e para aqueles com recidiva foi de 29,4 meses (IC= 18,11 a 40,7).

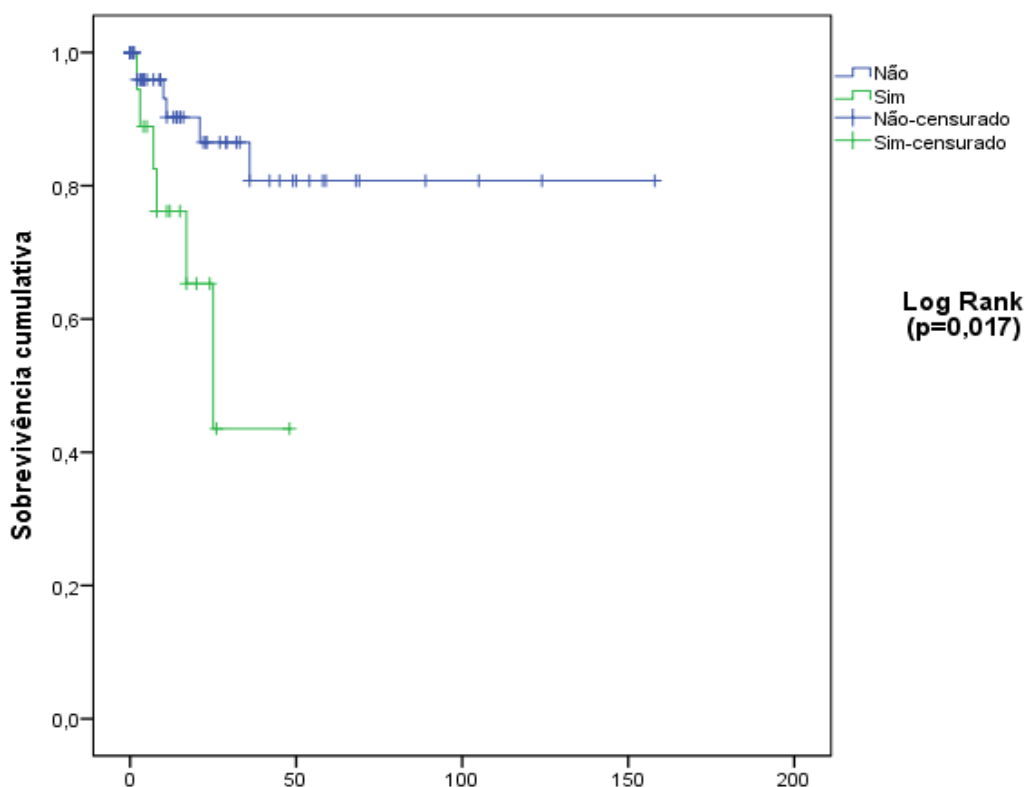


Figura 18 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com a recidiva nos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

4.4.3 Sobrevida Global de acordo com o Status Linfonodal

As curvas de sobrevida global de acordo com o envolvimento linfonodal não se mostraram com diferença estatisticamente significativa ($p=0,346$) segundo o teste Log Rank de Mantel-Cox conforme visto na Figura 19.

A sobrevida média estimada foi de 115,41 meses (IC = 99,31 a 131,52) para os pacientes com linfonodo negativo e para aqueles com linfonodo positivo foi de 56,77 meses (IC= 42,67 a 70,86).

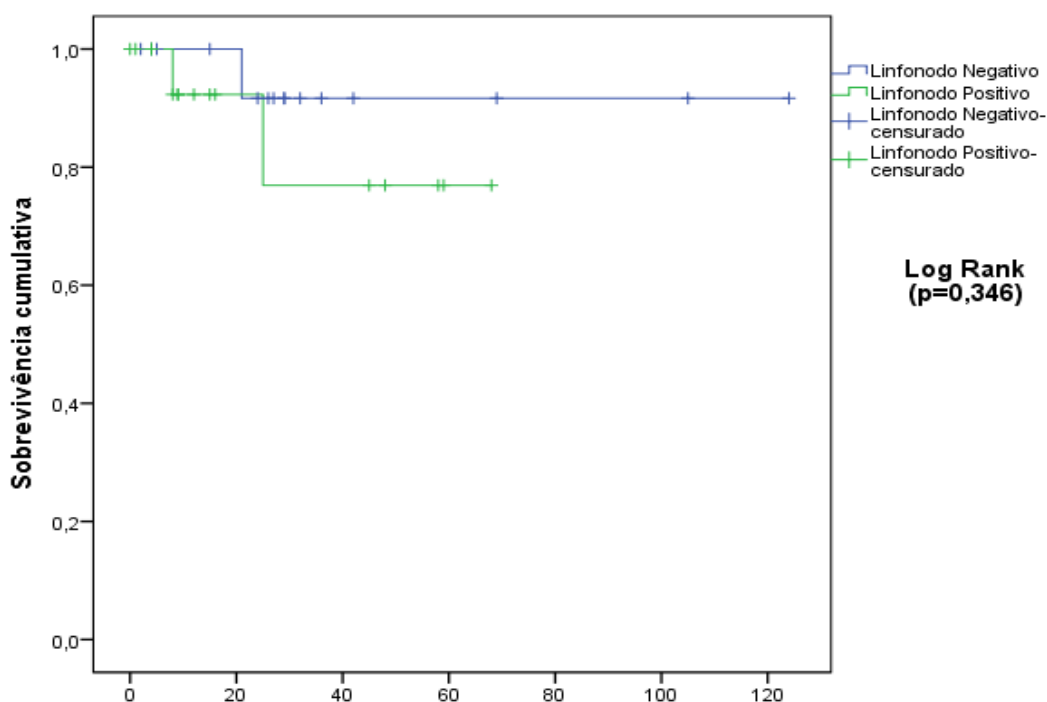


Figura 19 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com o status linfonodal dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

4.4.4 Sobrevida Global de acordo com a Expressão de PD-L1 nas células tumorais

As curvas de sobrevida global de acordo com a expressão de PD-L1 nas células tumorais não se mostraram com diferença estatisticamente significativa ($p=0,776$) segundo o teste Log Rank de Mantel-Cox conforme visto na Figura 20.

A sobrevida média estimada foi de 118,03 meses (IC = 92,66 a 143,40) para os pacientes com PD-L1 negativo e para aqueles com PD-L1 positivo foi de 96,41 meses (IC= 68,88 a 123,95).

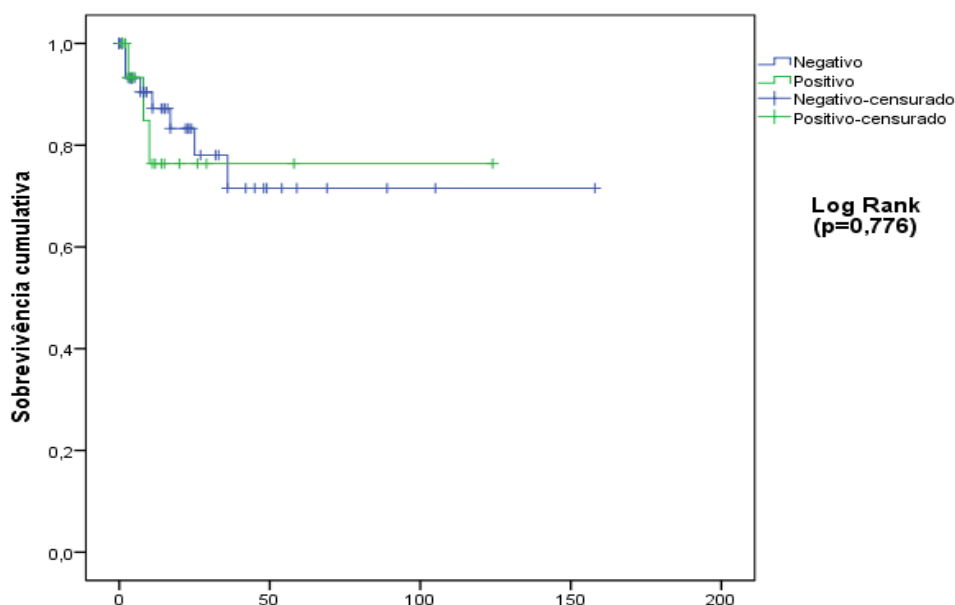


Figura 20 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com a expressão de PD-L1 em células tumorais dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

4.4.5 Sobrevida Global de acordo com o Estadio pT

A probabilidade acumulada de sobrevida foi de 95,8%, para os pacientes pT1 e 80,4% para o grupo de pacientes com estadiamento pT2, pT3 ou pT4, conforme visto na Figura 21.

A sobrevida média estimada foi de 144,44 meses (IC = 119,39 a 169,49) para os pacientes pT1 e para o grupo de pacientes com estadiamento pT2, pT3 ou pT4 foi de 83,25 meses (IC= 61,37 a 105,12).

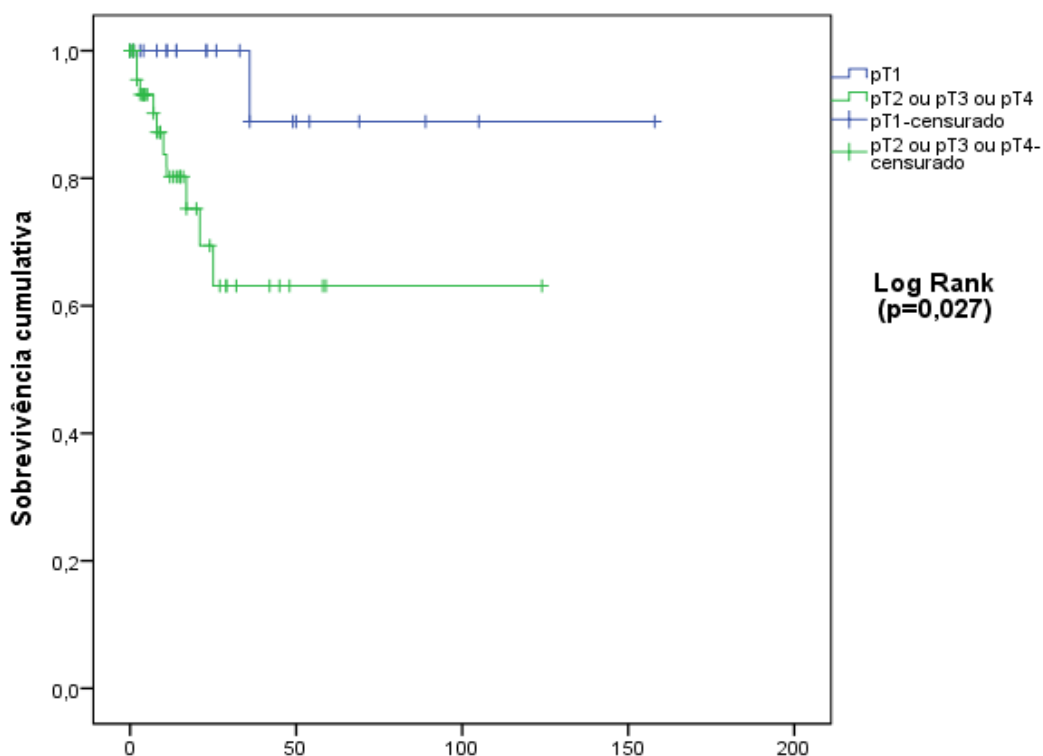


Figura 21 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com o estágio pT dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014

4.4.6 Sobrevida Global de acordo com grau Histológico

A probabilidade acumulada de sobrevida foi de 100,0%, para os pacientes com grau histológico bem diferenciado; 75% para os moderadamente diferenciado e 100% para os pouco diferenciado, conforme visto na Figura 22.

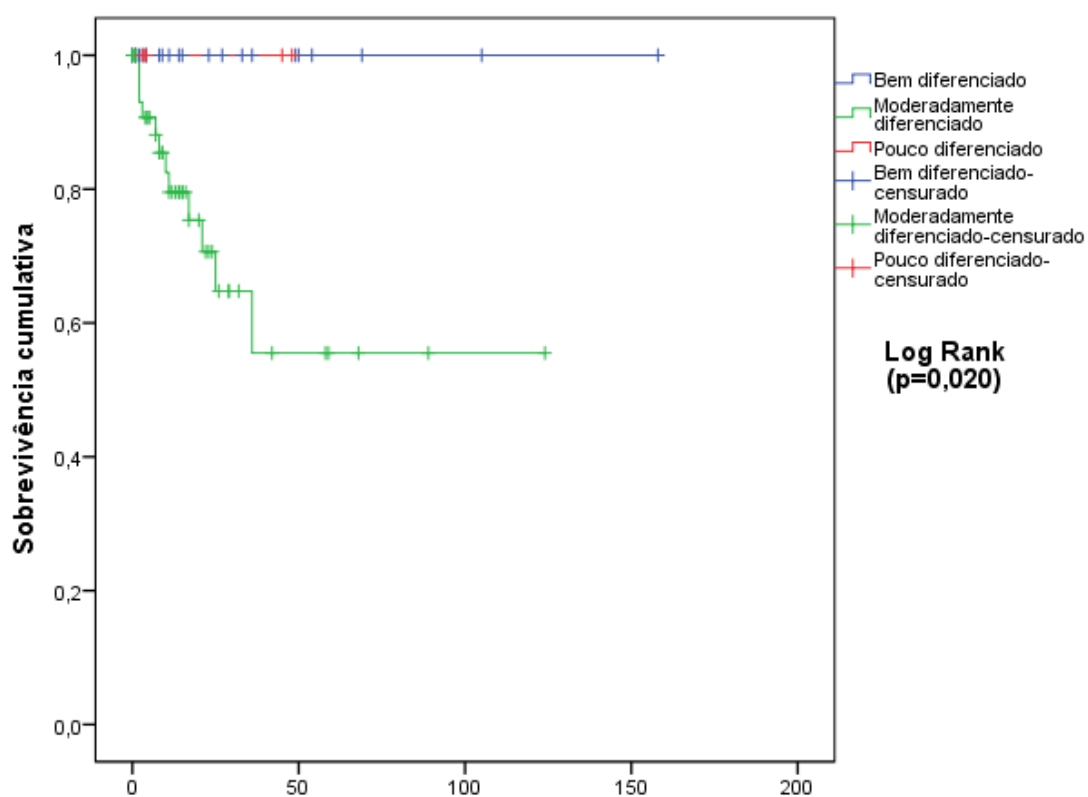


Figura 22 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com o grau histológico dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

4.4.7 Sobrevida Global de acordo com Invasão Neural

A probabilidade acumulada de sobrevida foi de 90,0%, para os pacientes em que não houve invasão neural e 75% para aqueles em que houve invasão neural, conforme visto na Figura 23.

A sobrevida média estimada foi de 130,38 meses (IC = 106,35 a 154,41) para os pacientes sem invasão neural e para aqueles com invasão foi de 39,26 meses (IC= 27,60 a 50,92).

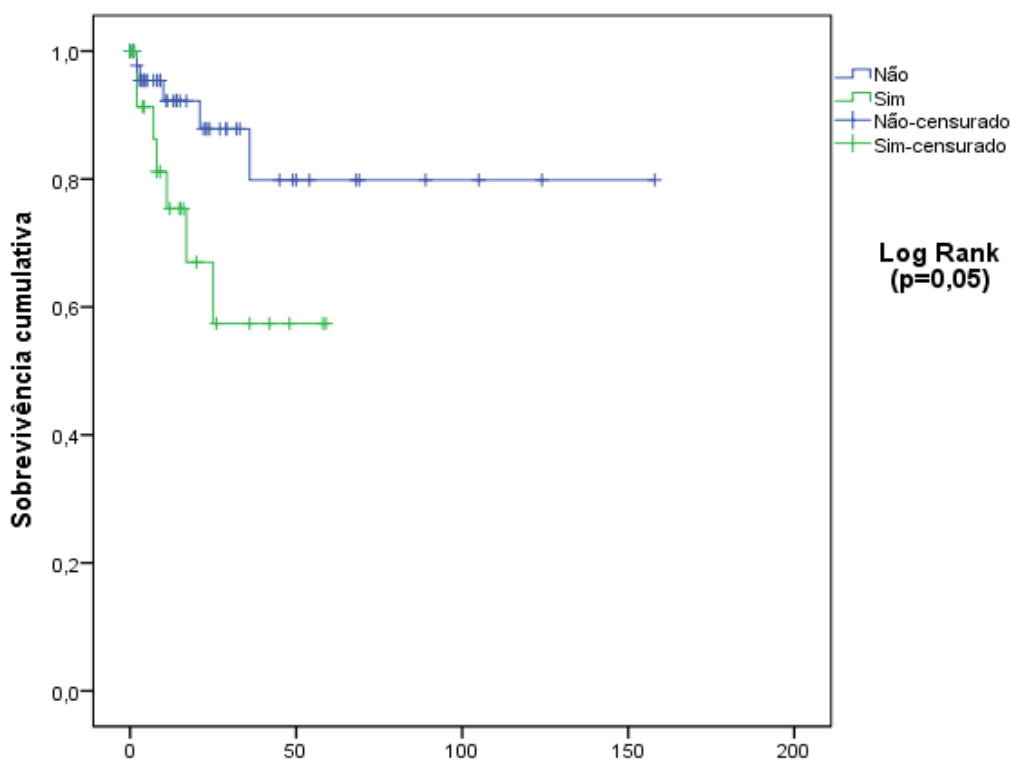


Figura 23 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com a invasão neural dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

4.4.8 Sobrevida Global de acordo com Idade

A probabilidade acumulada de sobrevida foi de 90,0%, para os pacientes que estavam abaixo da média de idade e 78,9% para aqueles acima, conforme visto na Figura 24.

A sobrevida média estimada foi de 105,77 meses (IC = 89,17 a 122,38) para os pacientes abaixo da média e para aqueles acima foi de 98,06 meses (IC= 59,60 a 136,52).

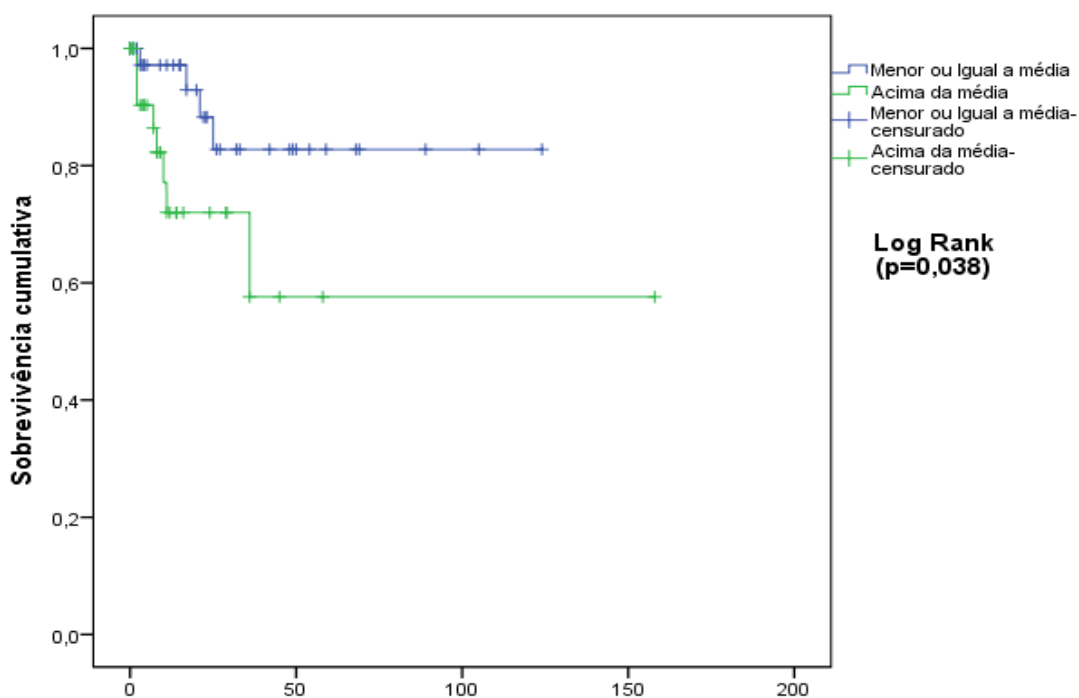


Figura 24 - Estimador de *Kaplan-Meier* para a curva de sobrevida de acordo com a idade dos pacientes com câncer de pênis tratados e em acompanhamento no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), no período entre janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

5 DISCUSSÃO

O Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba / Instituto do Câncer do Ceará recebe pacientes de diversas regiões do estado do Ceará, e mesmo de outros Estados do Brasil, para esclarecimento diagnóstico, tratamento e acompanhamento especializado. Na maioria das vezes, estes pacientes são encaminhados dos postos de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS), mas também de consultórios e hospitais particulares.

O câncer de pênis, objeto da nossa pesquisa, é considerado uma neoplasia rara em países desenvolvidos e sua ocorrência está quase sempre relacionada às más condições socioeconômicas (LYNCH e PETTAWAY 2002).

Alguns estudos já há algum tempo sugeriam que a incidência do câncer de pênis diminuía em alguns países, incluindo Finlândia, Dinamarca e Estados Unidos e algumas das razões dessa redução pareciam estar relacionadas com a atenção a higiene pessoal, nível de escolaridade e padrão socioeconômico (FRISCH et al. 1995; VATANASAPT et al. 1995).

Em nossa série, o Cape, a exemplo de trabalhos publicados na literatura, foi mais prevalente em pacientes a partir da quinta década de vida (PAULA et al. 2005; FAY 2014). Apesar da prática sexual com diferentes parceiros sem uso de preservativo ter sido implicada como fator de risco para o desenvolvimento da doença (SILVA et al. 2014; FAY 2014), a maioria dos nossos pacientes declarou-se casado o que limitaria o número de parceiras sexuais.

A distribuição dos casos de acordo com a etnia não pôde ser avaliada com segurança, uma vez que essa classificação é subjetiva diante da miscigenação da população brasileira. A despeito disso, a maioria declarou ser “não-branco”, dado meramente epidemiológico local, já que POW-SANG et al. (2002) e VELAZQUEZ e CUBILLA (2007) descreveram não haver encontrado diferença em relação a origem étnica. Além disso em estudo utilizando os dados do SEER, com cobertura de 83% da população americana, de 1998 a 2003 um total de 4967 casos de câncer de pênis foram diagnosticados e comparativamente, a incidência foi semelhante entre brancos e não-brancos (HERNANDEZ et al. 2008). Outro dado de nossa epidemiologia é que mais de 65% dos nossos casos eram provenientes do interior do Estado do Ceará.

O tamanho da lesão do carcinoma epidermóide do pênis pode ser variável e ter alguma relação com a etiopatogenia e o tempo de evolução de cada caso. Em nossa população 72,6% dos casos tinham tumores entre 1,01cm e 5,0cm. Mais de 65% dos nossos casos foram estadiados acima de pT1. Sabe-se que a escolha do tratamento depende do tamanho do tumor, sua posição na glândula ou no corpo do pênis e achados patológicos (VEERATTERAPILLAY et al. 2012). A exérese da lesão (biópsia excisional) com margens em lesões pequenas e superficiais pode algumas vezes prover o diagnóstico e a cura ao mesmo tempo, entretanto, apenas 1,19% dos nossos pacientes foram submetidos a tal procedimento. KIRRANDER et al. (2016) em trabalho publicado relataram taxa de 36% de exérese local em seus pacientes. Na maioria dos nossos casos foi realizada amputação parcial do pênis (82,14%) e o impacto de tal procedimento na qualidade de

vida dos pacientes é grande, por isso, antes do tratamento devem ser discutidos amplamente com o paciente os resultados esperados e as consequências das diferentes opções terapêuticas. O suporte psicossocial também é bastante útil para estes pacientes e o tratamento é feito muitas vezes com abordagem multidisciplinar.

A presença e extensão de metástases inguinais é sabidamente o fator prognóstico mais importante para a sobrevida em pacientes com câncer de pênis (BLEEKER et al. 2009). Em nossa pesquisa, devido à restrição de dados nos prontuários, não foi possível avaliar o acometimento linfonodal patológico em 54,8% dos pacientes. Talvez por esse motivo não obtivemos curva de sobrevida estatisticamente significativa para o status linfonodal (Figura 14). FICARRA et al. (2010) descreveram que pacientes classificados como tendo estágio pN0 tiveram uma taxa de sobrevida em 5 anos de 85% - 100%, enquanto que pacientes com qualquer envolvimento linfonodal (pN +) tiveram uma taxa de sobrevida em 5 anos de 16% a 45%.

Esses dados refletem o fato do avançado estado da doença em que os pacientes chegam ao nosso serviço. Reforçamos aqui que o encaminhamento precoce para o especialista ou centro de atenção especializado em tratamento de câncer é imprescindível.

Quanto às características morfotopográficas, a glândula foi a região do pênis mais acometida pelo carcinoma epidermóide (88,1%). Em trabalho publicado POW-SANG et al. (2002) relatou que 48% dos seus casos de carcinoma epidermóide de pênis se localizavam na glândula. Em 1993, no Canadá, MADEN et al. publicaram um estudo caso-controle com 219 homens com câncer no pênis, no qual 56,8 % apresentavam lesão na

glande. PAIVA et al. (2015) publicou em 2015 estudo no qual descreve a glândula como sítio de maior acometimento (80%).

Com relação ao Grau histológico em nossa população o grau moderadamente diferenciado mostrou-se maioria (61,9%) entre os casos e demonstrou ter impacto na sobrevida (Figura 22). Em seu estudo KIRRANDER et al. (2016) obteve 24,3% de pacientes com grau 2 (moderadamente diferenciado) em sua amostra e também houve piora na sobrevida deste grupo. No estudo de PAIVA et al. (2015) também houve predomínio de grau 2 (58%).

A nossa sobrevida mostrou ter relação direta com o estágio pT (Figura 21). No estudo de KIRRANDER et al. (2016) há um declínio na sobrevida dos pacientes pT1 quando comparados aos demais estágios pT.

Em 21,4% dos casos da nossa amostra houve recidiva e esta foi fator determinante na sobrevida (Figura 13) o que está de acordo com os dados de LEIJTE et al. (2008) que publicaram em 2008 estudo com população holandesa em que obtiveram recidiva em 29,3% dos 747 pacientes participantes de dois grandes centros de referência para carcinoma de pênis.

A atual literatura sobre CaPe não inclui a idade como importante fator prognóstico (PAIVA et al. 2015), entretanto, em nossa série houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida dos paciente mais jovens (Figura 24), bem como na série de KIRRANDER et al. (2016) o que não ocorreu no estudo de PAIVA et al. (2015) onde a sobrevida foi maior nos paciente mais velhos.

Outro resultado de nossa pesquisa que está de acordo com o descrito na literatura é a prevalência do subtipo usual do carcinoma epidermóide

(67,86%), como no estudo de PAIVA et al. (2015) em que 77% das amostras dos carcinomas epidermóides foram classificadas como subtipo usual.

Pesquisas e estudos clínicos tem sido realizadas para avaliar a significância potencial do PD-L1 como um biomarcador para imunoterapia do câncer (SORIA et al. 2013).

Algumas medicações como o pembrolizumabe por exemplo foram desenvolvidas para atuar na via PD-1 / PD-L1 bloqueando-a e assim evitando que as células cancerígenas consigam “esconder-se” do sistema imunológico. Tal medicação tem sido utilizada no tratamento de melanoma, câncer de pulmão de não-pequenas células (NSCLC), câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), linfoma de Hodgkin clássico (LHC), linfoma primário de células B do mediastino (PMBCL), carcinoma urotelial da bexiga, adenocarcinoma de junção gástrica ou gastroesofágica (GEJ), câncer do colo do útero, carcinoma hepatocelular, todos com teste positivo para “PD-L1”.

Em estudo publicado em 2015, BANG et al. avaliaram a segurança e eficácia de pembrolizumabe em pacientes com câncer de estômago avançado e concluíram que a droga demonstrou toxicidade manejável e atividade antitumoral promissora no câncer gástrico avançado.

Nanda e colaboradores publicaram em 2016 um estudo de fase Ib no qual descreveram evidências preliminares de atividade clínica e um potencial perfil de segurança do pembrolizumabe administrado em pacientes com lesões pré-tratadas de câncer de mama triplo negativo (Triple-negative breast cancer - TNBC) (NANDA et al. 2016).

MCDERMOTT et al. publicou apresentou na ASCO em 2018 que a monoterapia com pembrolizumabe demonstrou eficácia promissora e tolerabilidade aceitável em pacientes com carcinoma de células renais claras.

Em nossa população do estudo identificamos que 22,6% dos pacientes apresentaram-se como positivos para expressão de PD-L1 (Tabela 13). Sabe-se que cânceres PD-L1 positivos estão associados pior prognóstico em relação aos PD-L1 negativos (SORIA et al. 2013). UDAGER et al. (2016) encontrou 62,2% dos tumores primários positivos para a expressão de PD-L1. OTTENHOF et al. (2017) avaliou a expressão de PD-L1 em 200 espécimes de tumor de uma coorte europeia e obteve que a PD-L1 foi expressa em 48% dos carcinomas penianos primários. COCKS et al. (2016) revelou, em uma coorte norte-americana, que 40% dos 53 carcinomas epidermóides do pênis estudados tinham expressão PD-L1 positiva que foi expressa por uma proporção significativa de câncer peniano avançado. A nossa análise demonstrou associação estatisticamente significativa entre a expressão de PD-L1 e o estadiamento pT (Tabela 17).

Cabe aqui ressaltar que há esse viés ao se comparar positivities para PD-L1 entre estudos diferentes tendo em vista que existem diferentes plataformas (DAKO, ROCHE, VENTANA) para avaliação da expressão de PD-L1 com diferentes anticorpos como o 22C3 (utilizado em nossa pesquisa) 28-8, SP263, SP142 dentre outros.

Observamos, então, que por não haver uma padronização quanto a um *cutoff* para positividade há uma dificuldade no estabelecimento de relação entre os percentuais encontrados nos estudos.

Em estudos realizados em tumores de pulmão, por exemplo, essa avaliação pode ocorrer de maneiras distintas. GARON et al. em 2015 avaliaram a distribuição e proporção contínua de células PD-L1 positivas em qualquer intensidade. Já no estudo de BRAHMER et al. (2015) foi realizada avaliação por porcentagem de expressão (*immunohistochemistry score*) de qualquer intensidade sendo mais de 1% de células coradas: *Score 1*, mais de 5% de células coradas: *Score 2*, mais de 10% células coradas: *score 3*. KERR et al. (2015) utilizou 1%, 5%, 50% ou mais para considerar a expressão de PD-L1 positiva.

Recentemente um estudo do Grupo Brasileiro de Oncologia Torácica (GBOT), que escreveu sobre a prevalência da expressão de PD-L1 no câncer de pulmão no Brasil, mostrou menor prevalência da expressão de PD-L1 em relação aos dados da literatura. O estudo revisou retrospectivamente 1018 pacientes com câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC) avançado, em análises de imuno-histoquímica com anticorpo 22C3 PharmDx Dako, realizadas em quatro laboratórios de referência, no período de agosto e dezembro de 2017. As amostras válidas tiveram > 100 células tumorais por lâmina. A coloração de PD-L1 foi classificada como < 1%, 1- 49% ou ≥ 50% de coloração positiva das células tumorais (GELATTI et al. 2018).

Quanto à expressão de PD-L1 em células inflamatórias (Células Infiltrantes de Tumor), em nossa amostra 52,4% dos pacientes foram positivos. Dos 19 casos em que houve positividade para expressão de PD-L1 em células tumorais, 18 tinham expressão de PD-L1 positiva para células inflamatórias, com associação estatisticamente significativa (Tabela 17). A

nossa análise também demonstrou associação estatisticamente significativa entre a expressão de PD-L1 em células inflamatórias, o estadiamento pT e o grau histológico do tumor (Tabela 18). A análise multivariada realizada através de modelo de regressão logística multinomial demonstrou que a expressão de PD-L1 em células inflamatórias associou-se com 11,29 vezes a imunomarcção para PD-L1 em células tumorais (Tabela 21). Apesar de todas essas descrições favoráveis, em nossa amostra o PD-L1 não pareceu influenciar na sobrevida dos nossos pacientes (Figura 15). Variações quanto a escolha de *cutoffs* distintos para positividade de expressão e o tipo de amostra tecidual podem ter contribuído para esses resultados não satisfatórios.

Mesmo com um perfil de pacientes com tumores mais avançados, a sobrevida global dos nossos pacientes foi de 94,9% em 5 anos (Figura 12). Por esse motivo, não podemos deixar de destacar aqui que o entendimento da história natural, com o rápido e correto diagnóstico, estadiamento, seleção do tratamento adequado e o seguimento apropriado são fundamentais para os resultados favoráveis e sobretudo qualidade de vida nos pacientes com CaPe. Além disso, o papel potencial do PDL1 como um biomarcador para esta neoplasia precisa continuar em estudo.

Reforçamos ainda a importância do diagnóstico precoce, o que diminuiria as taxas de incidência de tumores em estágio avançado e propiciaria cirurgias menos mutilantes.

6 CONCLUSÕES

Concluimos nossa pesquisa ratificando que a expressão do PD-L1 em células tumorais no câncer de pênis esteve associado a pior prognóstico tendo em vista que houve associação positiva, estatisticamente significativa, com o estadiamento patológico pT.

Também houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de PD-L1 em células tumorais e a expressão de PD-L1 em células inflamatórias, células CD4 e células CD8.

Além disso, a recidiva, o estadiamento patológico (pT) e o grau histológico destacaram-se como fatores prognósticos relevantes na sobrevida.

A expressão de PD-L1 nos tumores avançados em nosso estudo reforça a importância de continuar a pesquisa para investigação adicional de anti-PD-1 e imunoterapêuticos anti-PD-L1 em pacientes com neoplasia peniana avançada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Imunologia celular e molecular**. Trad. de R. Gesteira. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. Omunidade mediada pelas células T; p.93-116.

Austin JW, Lu P, Majumder P, et al. STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF regulate PD-1 through multiple novel regulatory regions in murine T cells. **J Immunol** 2014; 192:4876-86.

Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes Control** 2009; 20:449-57.

Bang YJ, Chung HC, Shankaran V, et al. Relationship between PD-L1 expression and clinical outcomes in patients with advanced gastric cancer treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in KEYNOTE-012. **J Clin Oncol** 2015; 33(suppl 3):abstr 4001. [Presented at 51st ASCO Annual Meeting; May 29 – June 2, Chicago-III-USA].

Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-Sang J, Giuliano AR. Incidence trends in primary malignant penile cancer. **Urol Oncol** 2007; 25:361-7.

Barnes KT, McDowell BD, Button A, et al. Obesity is associated with increased risk of invasive penile cancer. **BMC Urol** 2016; 16:42.

Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discovery** 2009; 8:235-53.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001a; 91:2315-21.

Bezerra AL, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus DNA prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. **Am J Surg Pathol** 2001b; 25:673-8 2001.

Blank C, Brown I, Peterson AC, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. **Cancer Res** 2004; 64:1140-5.

Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunol Immunother** 2007; 56:739-45.

Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol** 2009; 27:141-50.

Boilly B, Vercoutter-edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, Le Bourhis X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. **Cytokine Growth Factor Rev** 2000; 11:295-302.

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2015; 373:123-35.

Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. **TNM classification of malignant tumours**. 8th ed. Oxford: John Wiley & Sons; 2017. Urological tumours; p184-7.

Brumini R, Torloni H, Gotlieb SLD, Henson DE, Souza JMP. **Cancer no Brasil: dados histopatológicos 1976-1980**. Brasília, Ministério da Saúde; 1982. p.118-9.

Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. **Urology** 2006; 67:797-802.

Carter L, Fouser LA, Jussif J, et al. PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. **Eur J Immunol** 2002; 32:634-43.

Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. **N Engl J Med** 2002; 346:1105-12.

Chan KW, Lam KY, Chan AC, Lau P, Srivastava G. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in penile carcinoma: a study of 41 cases using PCR. **J Clin Pathol** 1994; 47:823-6.

Chaves RN, Lima IMT, Duarte ABG, Buratini Jr J, Figueiredo JR. Caracterização estrutural do fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) e seu papel na fisiologia folicular ovariana. **Acta Scientiae Veterinariae** 2011, 39:90.

Chaux A, Velazquez EF, Algaba F, Ayala G, Cubilla AL. Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S7-14.

Cocks M, Taheri D, Ball MW, et al. Immune-checkpoint status in penile squamous cell carcinoma: a North American cohort. **Hum Pathol** 2017; 59:55-61.

Cubilla AL, Ayala MT, Barreto JE, Bellasai JG, Noël JC. Surface adenosquamous carcinoma of the penis: a report of three cases. **Am J Surg Pathol** 1996; 20:156-60.

Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S, Young RH. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. **Int J Surg Pathol** 2001; 9:111-20.

Cubilla AL, Velazquez EF, Ayala GE, Chaux AT. Identification of prognostic pathologic parameters in squamous cell carcinoma of the penis: significance and difficulties. **Pathol Case Rev** 2005; 10:3-13.

Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. **Int J Cancer** 2005; 116:606-16.

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.

Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. **Br Med J** 1950; 2:739-48.

Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:11-22.

Draper BW, Stock DW, Kimmel CB. Zebrafish FGF-24 functions with fgf8 to promote posterior mesodermal development. **Development** 2004; 130:4639-54.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-91; discussion 591-3.

Fay CES. **Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator tecidual no carcinoma de pênis**. Porto Alegre; 2014. [Dissertação de Mestrado- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul]

Ficarra V, Akduman B, Bouchot O, Palou J, Tobias-Machado M. Prognostic factors in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S66-73.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med** 2000; 192:1027-34.

Frisch M, Friis S, Kjaer SK, Melbye M. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population (Denmark 1943---90). **BMJ** 1995; 311:1471.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2015; 372:2018-28.

Gelatti AC, Moura F, Gaiger AM, et al. Lower prevalence of PD-L1 expression in advanced non-small lung cancer in Brazil. **J Clin Oncol** 2018; 36(suppl):e21140. [Presented at the ASCO Annual Meeting; June 1-5, Chicago-III-USA].

Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, Haas GP, Lancaster WD. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile invasive. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1705-9.

Golijanin D, Tan JY, Kazior A, et al. Cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1024-31.

Gou HF, Li X, Qiu M, Cheng K, Li LH, Dong H et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-RAS signaling pathway in penile squamous cell carcinoma. **PLoS One** 2013; 8:e0062175.

Gu W, Zhu Y, Ye D. Beyond chemotherapy for advanced disease-the role of EGFR and PD-1 inhibitors. **Transl Androl Urol** 2017; 6:848-54.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. **Urology** 2006; 68:148-53.

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.

Gunia S, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. p16(INK4a) is a marker of good prognosis for primary invasive penile squamous cell carcinoma: a multi-institutional study. **J Urol** 2012a; 187:899-907.

Gunia S, Kakies C, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. **J Clin Pathol** 2012b; 65:232-6.

Gunia S, Jain A, Koch S, Denzinger S, Götz S, Niessl N, May M. Periostin expression correlates with pT-stage, grading and tumour size, and independently predicts cancer-specific survival in surgically treated penile squamous cell carcinomas. **J Clin Pathol** 2013; 66:297-301.

Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:3360-5.

Heidenreich A, Thüer D, Pfister D. Value of targeted therapy for penile cancer. **Urologe** 2008; 47:1320-7.

Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States 1988-2003. **Cancer** 2008; 113(10 Suppl):2883-91.

Hu D, Goldie S. The economic burden of noncervical human papillomavirus disease in the United States. **Am J Obstet Gynecol** 2008; 198:500, e:1-7.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO J** 1992; 11:3887-95.

Itoh N, Ornitz D. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genet** 2004; 20:563-9.

Itoh N, Ornitz D. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **J Biochemistry** 2011; 149:121-30.

Jemal A, Simard EP, Dorell C, et al. Annual report to the Nation on the status of cancer 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:175-201.

Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. In: Ahmed R, Honjo T, editors. **Negative co-receptors and ligands. current topics in microbiology and immunology**. Berlin: Springer; 2010. p.17-38, v. 350.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. O núcleo celular; p.170.

Kageyama S, Ueda T, Kushima R, Sakamoto T. Primary adeno- squamous cell carcinoma of the male distal urethra: magnetic resonance imaging using a circular surface coil. **J Urol** 1997; 158:1913-4.

Kalinina J, Byron SA, Makarenkova HP. Homodimerization controls the fibroblast growth factor 9 subfamily's receptor binding and heparan sulfate-dependent diffusion in the extracellular matrix. **Mol Cell Biol** 2009; 29:4663-78.

Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, et al. Programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung cancer: in what state is this art? **J Thorac Oncol** 2015; 10:985-9.

Kirrander P, Sherif A, Friedrich B, et al. Swedish National Penile Cancer Register: incidence, tumour characteristics, management and survival. **BJU Int** 2016; 117:287-92.

Krustrup D, Jensen HL, van den Brule AJ, Frisch M. Histological characteristics of human papilloma-virus-positive and -negative invasive and in situ squamous cell tumours of the penis. **Int J Exp Pathol** 2009; 90:182-9.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD- L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat Immunol** 2001; 2:261-8.

Leijte JA, Kirrander P, Antonini N, et al. Recurrence patterns of squamous cell carcinoma of the penis: recommendations for follow-up based on a two-centre analysis of 700 patients. **Eur Urol** 2008; 54:161-8.

Lima MVA, Freitas FM, Tavares JM, Gonzaga-Silva LF. Partial glans penis cancer and immediate reconstruction with preputial flap: preliminary results. **Acta Urol** 2007; 4:33-7.

Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. **Int J Cancer** 2006; 119:1078-81.

Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. **J Urol** 1996; 156:1637-42.

Lynch DFJ, Pettaway CA. Tumors of the penis. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. **Campbell's urology**. 8th ed. New York: Elsevier; 2002. p.2945-81.

Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, et al. History of circumcision, medical conditions and sexual activity and risk of penile cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:19-24.

McDermott DF, Lee JL, Szczylik C, et al. Pembrolizumab monotherapy as first-line therapy in advanced clear cell renal cell carcinoma (ccRCC): results from cohort A of KEYNOTE-427. **J Clin Oncol** 2018; 36(suppl):4500. [Presented at the ASCO Annual Meeting; June 1-5, Chicago-III-USA].

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

Minhas S, Manseck A, Watya S, Hegarty PK. Penile cancer--prevention and premalignant conditions. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S24-35.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Cancer. **Atlas on-line de mortalidade**. Disponível em: <URL:<https://bit.ly/2IYtiOB>> [2017 ago 12].

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.

Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Cytokine Growth Factor Rev** 2005; 16:107-37.

Mosconi AM, Roila F, Gatta G, Theodore C. Cancer of the penis. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 53:165-77.

Muneer A, Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S. Molecular prognostic factors in penile cancer. **World J Urol** 2009; 27:161-7.

[NCI] National Cancer Institute, Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer Statistics Review 1975-2014**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2VCDLFn>> [2018 ago 12].

Nanda R, Chow LQM, Dees EC. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: phase Ib KEYNOTE-012 Study. **Clin Oncol** 2016; 34:2460-7.

Nasca MR, Innocenzi D, Micalli G. Penile cancer among patients with genital lichen sclerosus. **J Am Acad Dermatol** 1999; 41:911-4.

Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. **Int J Biochem Cell Biol** 2000; 32:115-20.

Ornellas AA, Seixas ALC, Marota A, Wisnecky A, Campos F, Moraes JR. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. **J Urol** 1994; 151:1244-9.

Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BLB, Wisnecky 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.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol** 2001; 2:3005.1-3005.12.

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. **J Biol Chemistry** 1996; 271:15292-7.

Ottenhof SR, Djajadiningrat RS, de Jong J, et al. Expression of programmed death ligand 1 in penile cancer is of prognostic value and associated with HPV status. **J Urol** 2017; 197:690-7.

Pahwa M, Girotra M, Rautela A, Abraham R. Penile cancer in India: a clinicoepidemiological study. **Gulf J Oncol** 2012; 1:7-10.

Paiva GR, Araújo IBO, Athanazio DA. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. **Int Urol Nephrol** 2015; 47:295-9.

Paula AAP, Almeida Netto JC, Cruz AD, Freitas Junior R. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. **Rev Bras Cancerol** 2005; 51:243-52.

Pizzocaro G, Piva L, Nicolai N. Improved management of nodal metastases of squamous cell carcinoma (scc) of the penis. **J Urol** 1995; 153:246a.

Pow-Sang MR, Benavente V, Pow-Sang JE, Morante C, Meza L Baker M, Pow-Sang JM. Cancer of penis. **Cancer Control J** 2002; 9:305-14.

Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sang JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S2-6.

Powell J, Robson A, Cranston D, et al. High incidence of lichen sclerosus in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **Br J Dermatol** 2001; 145:85-9.

Protzel C, Spiess PE. Molecular research in penile cancer – lessons learned from the past and bright horizons of the future? **Int J Mol Sci** 2013; 14:19494-505.

Prowse DM, Ktori EN, Chandrasekaran D, Prapa A, Baithun S. Human papillomavirus associated increase in p16INK4A expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. **Br J Dermatol** 2008; 158:261-5.

Ragsdale BD. Tumors with fatty, muscular, osseous, and/or cartilaginous differentiation. In: Elder ED, Elenitsas R, Johnson BL Jr, Murphy GF, Xu X, editors. **Lever's histopathology of the skin**. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.1057-106.

Roitt I, Brostoff J, Male D. **Imunologia**. Trad. De I. C. Gubert. 5^a ed. São Paulo: Manole; 1999. Ativação de Linfócitos; p.212-33.

Romero FR, de Castro MG, Garcia CR, et al. Adenosquamous carcinoma of the penis. **Clinics** 2006; 61:363-4.

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

Salvioni R, Necchi A, Piva L, Colecchia M, Nicolai N. Penile cancer. **Urol Oncol** 2009; 27:677-85.

Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro Brazil: HPV typing and clinical features. **Int Braz J Urol** 2008; 34:467-76.

Sewell J, Ranasinghe W, De Silva D, et al. Trends in penile cancer: a comparative study between Australia, England and Wales, and the US. **Springerplus** 2015; 4:420.

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nat Immunol** 2007; 8:239-45.

Shaw AT, Winslow MM, Magendantz M, et al. Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:8773-8.

Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). **Genomics** 1994; 23:704-6.

Silva RS, Silva AC, Nascimento SG, Oliveira CM, Bonfim CV. Aspectos demográficos e epidemiológicos da mortalidade por câncer no pênis. **Acta Paul Enferm** 2014; 27:44-7.

Slopnick EA, Kim SP, Kiechle JE, Gonzalez CM, Zhu H, Abouassaly R. Racial disparities differ for African Americans and Hispanics in the diagnosis and treatment of penile cancer. **Urology** 2016; 96:22-8.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Soria JC, Cruz C, Bahleda R, et al. Clinical activity, safety and biomarkers of PDL1 blockade in nonsmall cell lung cancer: additional analyses from a clinical study of the engineered antibody MPDL3280A (antiPDL1). **Eur J Cancer** 2013; 49(suppl 2):A3408. (Presented European Cancer Congress, 27 Sep - 01 Oct 2013, Amsterdam, Netherlands]

Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. **Sci Transl Med** 2012; 4:127ra37.

Thomas RB, Slaton JW, Pettway CA. Contemporary morbidity from lymphadenectomy for penile squamous cell carcinoma: the M.D. Anderson Cancer Center experience. **J Urol** 2002; 167:1638-42.

Thomas MA, Nangia AK. Squamous cell carcinoma of the penis following penile trauma. **J Urol** 2004; 171:341-2.

Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:17174-9.

Tseng HF, Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a population-based case ± control study in Los Angeles County (United States). **Cancer Causes Control** 2001; 12:267-77.

Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:116-29.

Udager AM, Liu TY, Skala SL, et al. Frequent PD-L1 expression in primary and metastatic penile squamous cell carcinoma: potential opportunities for immunotherapeutic approaches. **Ann Oncol** 2016; 27:1706-12.

Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, et al. Cancer incidence in Thailand 1988-1991. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1995; 4:475-83.

Veeratterapillay R, Sahadevan K, Aluru P, Asterling S, Rao GS, Greene D. Organ-preserving surgery for penile cancer: description of techniques and surgical outcomes. **BJU Int** 2012; 110:1792-95.

Velazquez EF, Cubilla AL. Penile squamous cell carcinoma: anatomic, pathologic and viral studies in Paraguay (1993-2007). **Anal Quant Cytol Histol** 2007; 29:185-98.

Velazquez EF, Melamed J, Barreto JE, et al. Sarcomatoid carcinoma of the penis: a clinicopathologic study of 15 cases. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1152-8.

Villa LL, Lopes A. Human papillomavirus dna sequences in penile carcinomas in Brazil. **Int J Cancer** 1986; 37:853-5.

Yesudian PD, Sugunendran H, Bates CM, O'Mahony C. Lichen sclerosus. **Int J STD AIDS** 2005; 16:465-73, test 474.

Zeidler JD. **Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor.** São Paulo; 2012. [Tese de doutorado-Universidade de São Paulo]

Zequi SC, Soares FA, Lopes A. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer: a multicenter study. **J Sex Med** 2012; 9:1860-7.

Wabinga HR, Parkin DM, Wabwire-Mangen F, Namboozee S. Trends in cancer incidence in Kyadondo County, Uganda 1960-1997. **Br J Cancer** 2000; 82:1585-92.

Williamson SR, Zhang S, Lopez-Beltran A, et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:474-83.

Winkelstein W. Smoking and cancer of the uterine cervix:hypothesis. **Am J Epidemiol** 1977; 106:257-9.

Apêndice 1 – Formulário de coleta de dados

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Identificador do Paciente									
Número do Exame									
Data de Entrada									
Data da Macroscopia									
Data da Cirurgia									
Data do Laudo									
Data de Nascimento									
Idade à admissão									
Local de Nascimento									
Local de Residência									
Estado Civil		solteiro	casado	separado	outros	desquitado	viúvo	concubinado	
Etnia	ignorado	branca	amarela	negra	mulata	pardo	moreno	indígena	
Cirurgia		amputação parcial	amputação total	exérese da lesão	postectomia ampliada	AIIA inter-íleoabdominal	emascuação	biopsia incional	outra
outra, qual									
Tipo de Esvaziamento Linfonodal	não	inguinal	inguino-ilíaco						
estadio T	Tis	T1	T2	T3	T4				
estadio N	N0	N1	N2	N3					
estadio M	M0	M1							
Esvaziamento linfonodal	não	Inguinal	Inguino-ilíaco	Linfonodo sentinela	Inguinal + pelvico obturatório	Pélvica	pélvica estendida		
glande base	não não	sim sim							

haste	não	sim							
prepucio	não	sim							
sulco balanoprepucial (sbp)	não	sim							
Tipo Histológico		Carcinoma Epidermoide	Adenoessamoso	Carcinoma Basocelular	Doença de Paget	Melanoma	Linfoma	Sarcoma	Metástase
se Epidermoide, tipo:		usual	Basaloide	Condilomatoso	Warty	Verrucoso	Papilífero	Sarcomatoide	Pseudohiperplásico
Grau Histológico		bem diferenciado	moderadamente diferenciado	pouco diferenciado					
Invasao Neural	não	sim							
InvasãoVascular	não	sim							
Invasao Uretra	não	sim							
Invasao Orgãos adjacentes	não	sim							
Status final		vivo sem doença	vivo com doença	óbito por câncer	óbito por outra causa	perdido de vista			
Recidiva de doença	não	coto de amputação	regional	coto + regional					