AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PD-L1 EM CARCINOMAS DE PÊNIS

ANDRÉ FELLIPE FREITAS RODRIGUES

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. Luiz Euribel Prestes Carneiro

São Paulo
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada no Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

R696 Rodrigues, André Fellipe Freitas
Avaliação da expressão imunohistoquímica de PD-L1 em carcinomas de pênis / André Fellipe Freitas Rodrigues - São Paulo; 2020.
31p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 2. Imunohistoquímica/ Immunohistochemistry. 3. Imunoterapia/Immunotherapy

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

EPÍGRAFE

"Hoje vemos como por um espelho, confusamente; mas então veremos face a face. Hoje conheço em parte; mas então conhecerei totalmente, como eu sou conhecido."

I Coríntios, 13

DEDICATÓRIA

A minha esposa Gabriela, aos meus filhos Felipe, Lucas e Maria Alice.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Senhor Jesus Cristo, por me conceder o dom da vida e tantas maravilhas em minha vida. Sou grato a minha esposa Gabriela e meus filhos Felipe, Lucas e Maria Alice, pelo amor, dedicação, carinho e principalmente a imensurável paciência.

Agradeço o Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por me orientar, ajudar e mesmo com tantas dificuldades, acreditar na conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Euribel Prestes Carneiro, por me apresentar a beleza da Ciência desde a graduação, pelos valiosos conselhos e pela sua maravilhosa amizade.

Aos meus familiares, amigos e colegas de trabalho, pela convivência, companheirismo, por me apoiarem na conclusão desta tese.

Agradeço à pós-graduação do A.C.Camargo, por terem tido compreensão e paciência, diante das pedras no caminho.

RESUMO

Rodrigues AFF. **Avaliação da expressão imunohistoquímica de PD-L1 em carcinomas de pênis**. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

INTRODUÇÃO: O carcinoma de pênis (CaPe) é uma doença devastadora do ponto de vista físico e psicológico. Sua etiopatogenia é pouco conhecida e o tratamento limitado. Existem evidências do papel de células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos no prognóstico desses tumores. Com o avanço do conhecimento da imunoterapia, esta possibilidade se abre para os casos avançados de CaPe. Um dos biomarcadores preditivos para o seu uso é a expressão da proteína ligante (PD-L1) ao receptor programado de morte celular (PD-1). No momento, pouco se sabe sobre o padrão de imunoexpressão deste biomarcador no CaPe e sua relação com as características clinico-patológicos destes pacientes. **OBJETIVO:** Avaliar a presença, por imunohistoquímica de PD-L1 em CaPe, a relação de linfócitos nos microambiente tumoral e a relação com variáveis clínico-patológicas em pacientes com CaPe. **METODOLOGIA:** Por imunohistoquímica foi avaliada a presença de PD-L1 em células tumorais e células inflamatórias: macrófagos, CD4, CD8 e CD20 em biopsias de 49 pacientes com diagnostico prévio de CaPe. Os dados foram analisados utilizando o programa R versão 3.5. O teste exato de Fisher foi empregado para comparação estatística entre a expressão de PD-L1 em células tumorais e macrófagos, CD4, CD8 e CD20 e nas variáveis clínico-patológicas. **RESULTADOS:** Em relação às características clínico-patológicas, 55,1% dos pacientes eram casados, 61,2% foram submetidos a penectomia parcial, 71.4% não necessitou de esvaziamento linfonodal, sendo 49% localizado na glande. A histologia usual para esse tumor estava presente em 64,6% dos pacientes. Em relação ao processo de invasão da neoplasia a outros tecidos, 81,6% apresentaram invasão ao corpo esponjoso, 75,5% não apresentou invasão à uretra, 89,8% não apresentou invasão vascular. As células tumorais do CaPe expressaram PD-L1 em 19% dos casos. Esta se associou positivamente com o predomínio de células CD4 e CD20 no microambiente tumoral. **CONCLUSÃO:** Por imunohistoquímica PD-L1 foi expresso em cerca de um quinto dos casos e se associou a uma resposta imune anérgica. Embora expresso na minoria dos casos, a capacidade da célula neoplásica ter o inibidor de *check-point* com o mecanismo de evasão da resposta imune levanta a possibilidade de se testar a imunoterapia como estratégia terapêutica em casos selecionados.

Descritores: Neoplasias Penianas. Imuno-histoquímica. Imunoterapia.

ABSTRACT

Rodrigues AFF. **[Evaluation of the immunohistochemical expression of PD-L1 in penis carcinomas]**. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

INTRODUCTION: Penile carcinoma (PeCa) is a physically and psychologically devastating disease. Knowledge of its etiopathogenesis and its treatment is limited. There is evidence of the role of immune system cells such as macrophages and lymphocytes in the prognosis of these tumors. With the advance of immunotherapy knowledge, this possibility opens up for advanced cases of PeCa. One of the predictive biomarkers for its use is the expression of the binding protein (PD-L1) to the programmed cell death receptor (PD-1). At the moment, little is known about the immunoexpression pattern of this biomarker on PeCa and its relationship with the clinical and pathological characteristics of these patients. **OBJECTIVE:** To evaluate the presence, by immunohistochemistry of PD-L1 in PeCa, the relationship of macrophages and lymphocytes in the tumor microenvironment and the relationship with clinical-pathological variables in patients with PeCa. **METHODOLOGY:** The presence of PD-L1 in tumor cells and inflammatory cells: macrophages, CD4, CD8 and CD20 cells in biopsies of 49 patients with the previous diagnosis of PeCa were evaluated. The data were analyzed using the R version 3.5 program. Fisher's exact test was used for statistical comparison between the expression of PD-L1 in tumor cells and macrophages, CD4, CD8, and CD20 cells and in the clinical-pathological variables. **RESULTS:** Regarding the clinical and pathological characteristics, 55.1% of the patients were married, 61.2% underwent partial penectomy; 71.4% did not require lymph node dissection and 49% of which were located in the glans. The usual histology for this tumor was present in 64.6% of the patients. Regarding the process of invasion of the neoplasm to other tissues, 81.6% presented invasion to the spongy body of penis; 75.5% did not present invasion to the urethra and 89.8% did not show vascular invasion. Tumor cells from CaPe expressed PD-L1 in 19% of cases. This was positively associated with the predominance of CD4 and CD20 cells in the tumor microenvironment. **CONCLUSION:** By immunohistochemistry PD-L1 was expressed in about one-fifth of the cases and was associated with an anergic immune response. Although expressed in a minority of cases, the ability of the neoplastic cell to have the checkpoint inhibitor with the immune response evasion mechanisms raises the possibility of testing immunotherapy as a therapeutic strategy in selected cases.

Keywords: Penile Neoplasms. Immunohistochemistry. Immunotherapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Imunoexpressão de PD-L1 16

Figura 2 Imunoexpressão de CD4, CD8 e CD20 17

Figura 3 Distribuição dos resultados de PD-L1, CD4, CD8 e CD20 18

Tabela 1 Anticorpos primários, clones, fabricantes, padrão de coloração e células coradas 9

Tabela 2 Dados clínicos e patológicos dos 49 pacientes 13

Tabela 3 Teste Exato de *Fisher* para expressão de PD-L1, CD4, CD8 e CD20.... 19

Tabela 4 Teste Exato de *Fisher* para PD-L1 com os dados clínico-patológicos ... 19

LISTA DE ABREVIAÇÕES

APC	célula apresentadora de antígeno
BCG	bacilo Calmette-Guérin
BSA	albumina bovina
CaPe	carcinoma de pênis
CGA	campo de grande ampliação
CI	células inflamatórias
CT	células tumorais
CTLA-4	*Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*
EBV	Epstein-Barr
HE	Hematoxilina e Eosina
HPV	papilomavírus humano
LH	Linfoma de Hodgkin
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	*Programmed Cell Death 1 Receptor*
PD-L1	*Programmed Cell Death 1 Ligand*
RCC	carcinoma de células renais
rIFN	interferon recombinante gama
rTNF-alfa	fator de necrose tumoral alfa recombinante
TIL	linfócitos infiltrantes de tumores
TMA	*Tissue microarrays*
Treg	linfócito T regulatórios
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Câncer de pênis 1

1.2 Resposta Imune aos Tumores Penianos 2

1.3 Imunoterapia aplicada ao câncer 3

1.4 PD-L1 e às perspectivas no CaPe 5

2 JUSTIFICATIVA 7

3 OBJETIVOS 8

3.1 Objetivo Geral 8

3.2 Objetivos Específicos 8

4 MATERIAIS E MÉTODOS 9

4.1 Aspectos Éticos 10

4.2 Riscos e Benefícios aos pacientes voluntários da pesquisa 11

4.3 Protocolo de Reações 11

4.4 Forma de análise dos resultados 11

4.5 Análise Estatística 12

5 RESULTADOS 13

6 DISCUSSÃO 21

7 CONCLUSÕES 23

8 REFERÊNCIAS 24

APÊNDICE

Apêndice 1 Figuras 1 e 2. Dados brutos para análises estatísticas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PÊNIS

O carcinoma de pênis (CaPe) é uma doença devastadora do ponto de vista físico e psicológico, o Brasil apresenta uma das maiores incidências do mundo, correspondendo aproximadamente a 2,6% das neoplasias malignas do sexo masculino. Em regiões como o Norte e o Nordeste têm freqüência relativa de 5,3% e 5,7% respectivamente, como no estado do Maranhão onde há incidência de 6,1 casos para 100 mil habitantes (Brumini 1982; Favorito et al. 2008; Coelho et al. 2018). Nos países desenvolvidos como os Estados Unidos, a incidência dessa doença é baixa, representando apenas 0,4 a 0,6% de todas as neoplasias malignas do sexo masculino (Coelho et al. 2018).

Os carcinomas derivados do epitélio pluriestratificado, tanto da glande como do sulco coronal e prepúcio correspondem a 95% de todos os casos de câncer de pênis (Cubilla et al. 1993; Cubilla et al. 2009; Velazquez e Cubilla 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a classificação histopatológica do CaPe, onde se destacam uma grande variedade de subtipos, tais como o carcinoma basalóide em suas variantes verrucosas (condilomatoso, papilífero e verrucoso), os carcinomas sarcomatóides (Cubilla et al. 2004) e outros novos tipos histológicos como o carcinoma pseudoglandular (Cunha et al. 2009).

A etiopatogenia do CaPe é pouco conhecida. A presença de fimose, más condições de higiene e baixo padrão sócio-econômico são os principais fatores de risco para seu desenvolvimento (Misra et al 2004; Favorito et al. 2008). Outros fatores incluem o número de parceiros sexuais, tabagismo e sexo com animais (Bleeker et al. 2009; Zequi et al. 2012). A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) está presente em cerca de 40% dos casos, com predileção por certos tipos histológicos, como o condilomatoso e o basalóide (Backes et al. 2009; Muneer et al. 2009).

Os dados morfológicos, além da classificação correta do subtipo, podem dar informações úteis em relação ao comportamento biológico do tumor. Dentre eles podemos destacar o tipo histológico (Cubilla et al. 2000) grau histológico (Velazquez et al. 2008), a invasão vascular (Lopes et al. 1996), a invasão perineural (Ayala et al. 2009) e o padrão de invasão do tumor (Guimarães et al. 2006), como aspectos importantes na predição das metástases linfonodais e da sobrevida.

O CaPe é essencialmente uma doença locorregional. O desenvolvimento de doença metastática à distância é pouco frequente e a sobrevida dos pacientes é determinada pela recorrência linfonodal (Lopes et al. 1996). O tempo da linfadenectomia é fator importante no prognóstico, sendo que pacientes com linfadenectomias tardias apresentam pior evolução (Ornellas et al. 2008). A dissecção linfonodal inguino-ilíaca é parte importante da terapêutica, porém apresenta índices elevados de morbidade e a seleção dos pacientes deve ser criteriosa (Coblentz e Theodorescu 2002). A avaliação clínica dos linfonodos não mostra grande acurácia na predição da presença de metástases. Cerca de 50% dos linfonodos inguinais clinicamente suspeitos não apresentam comprometimento microscópico pelo tumor à histologia. A linfonodomegalia, nestes casos, ocorre como conseqüência de infecção associada ao tumor primário (Lopes et al. 1996). Por outro lado 10-20% dos pacientes com linfonodos clinicamente negativos apresentam metástases microscópicas (Horenblas 2001). Os melhores métodos para evitar a linfadenectomia desnecessária, como a biópsia do linfonodo sentinela é controversa na literatura (Heyns e Theron 2008; Crawshaw et al. 2009; Jensen et al. 2009).

1.2 RESPOSTA IMUNE AOS TUMORES PENIANOS

Pouco se conhece a respeito do papel do infiltrado inflamatório em CaPe. Em um estudo com 145 pacientes a presença de eosinofilia peritumoral foi associada à favorável sobrevida (Lopes et al. 1996). Em outro estudo usando a mesma metodologia foram avaliados dezessete pacientes e foi demonstrado que eosinofilia peritumoral favorece a sobrevida de pacientes com CaPe avançado (Ono et al. 2002). Ficarra et al. (2002) investigaram infiltrado mononuclear peritumoral como fator prognóstico mas não houve associação estatística. Também foi investigado a associação entre HPV, presença de infiltrado mononuclear peritumoral e eosinofilia em 82 pacientes com CaPe, mas não foram encontradas associações (Bezerra, et al. 2001). Um estudo que avaliou a atividade de células *Natural Killer* (NK) no sangue periférico de 39 pacientes com CaPe, revelou que a atividade dessas células foi estatisticamente diminuída em relação ao grupo controle (Campos et al. 1998).

No trabalho de mestrado realizado no A.C.Camargo Cancer Center intitulado "*Estudo da resposta imune peritumoral em carcinomas de pênis*" que resultou na publicação *"Pathologic and imunohistochemical characterization of tumoral inflammatory cell infiltrate in invasive penile squamous cell carcinomas: Fox-P3 expression is an independent predictor of recurrence"* (Vassallo et al. 2015) foram avaliadas a presença de células do infiltrado

inflamatório peritumoral imunorreativas para CD20, CD3, CD4, CD8, CD56, CD1a, HLA-DR, S100, CD68, CD138, Fox-P3, Granzima B, Perforina, TGF-β e p16, além do sequenciamento de HPV-DNA e associou-se as variáveis clinicopatológicas. Os pacientes foram divididos em dois grupos HPV positivo e negativo. Os pacientes que foram classificados como infectados por HPV de alto risco e apresentaram alta imunoexpressão de células inflamatórias peritumorais Fox-P3^{+}. Os pacientes infectados com HPV de baixo risco que apresentaram negatividade para este marcador. Dentre vários resultados estatísticos, foi realizada análise multivariada sendo que em pacientes com carcinoma epidermóide de pênis a expressão de infiltrado inflamatório Fox-P3^{+} resultou em preditor independente de recidiva tumoral.

Essas células, denominadas CD4^{+}CD25^{+}, Fox-P3^{+} ou ainda células Treg, foram avaliadas em tumores de outras topografias como carcinoma gástrico e esofágico, onde o aumento de Treg está relacionado à menor sobrevida em relação aos pacientes com baixa proporção dessas células (Kono et al. 2006). No carcinoma gástrico, a maior proporção de linfócitos infiltrantes de tumores (TIL) especialmente os linfócito T regulatórios (Treg) relaciona-se a progressão da doença, quanto mais avançada a neoplasia maior a quantidade de Treg (Kawaiada et al. 2005). No carcinoma hepatocelular a alta prevalência de Treg indica desfavorável prognóstico (Kobayashi et al. 2007). Cunha et al. (2012) conduziu uma investigação sobre o papel de Treg por meio da expressão imunoistoquímica de FoxP3^{+} e demonstrou que sua expressão tem influência importante em várias características de agressividade em carcinomas diferenciados de tireóide. Em outro estudo, avaliou-se a distribuição e significado biológico de Treg em pacientes com Linfoma de Hodgkin (LH) por meio de *Tissue microarrays* (TMA) utilizando biópsias de 130 pacientes e imunomarcadas com anticorpos CD4, CD8, CD25 e Fox-P3. Observou-se que Fox-P3 está associado com a infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e pior prognóstico (Assis et al. 2012). Sendo assim, há evidências em diferentes tipos de tumores que células Treg participam de alguma forma do escape do tumor ao sistema imune caracterizando-se como pró-tumoral, devido a sua atividade imunossupressora e tolerogênica.

1.3 IMUNOTERAPIA APLICADA AO CÂNCER

Os primeiros estudos de imunologia relacionados ao câncer ocorreram no final do século XIX, quando o cirurgião americano William Coley relatou a diminuição de um sarcoma após a injeção de resíduos bacterianos em alguns sítios tumorais (McCarthy 2006).

Muitos anos depois, Morales e Cohen (2016) realizaram o primeiro grande ensaio clínico com bacilo Calmette-Guérin (BCG) intravesical em pacientes com câncer de bexiga em fase inicial, no qual reações imunoinflamatórias eram bem sucedidas no controle da doença. Em 1981 foi publicado estudo com aplicação de interleucina-2 (IL-2) endovenosa em pacientes com melanoma com o intuito de estimular a ativação e proliferação de linfócitos *in vivo* (Hersey et al. 1981). Alguns anos mais tarde, em 1985, ocorreu um estudo com interferon alfa endovenoso e intramuscular para melanoma, com evidente atividade antitumoral (Kirkwood e Ernstoff 1985).

O primeiro estudo com fator de necrose tumoral alfa recombinante (rTNF-alfa) em combinação com interferon recombinante gama (rIFN) e melfalan em pacientes com sarcoma e melanoma ocorreu em 1992, com resultados eficientes e mínima toxicidade (Lienard et al. 1992). Dez anos mais tarde em 2002, foi publicado estudo de transferência de células T reativas em melanoma, que revelou a regressão tumoral e destruição autoimune dos melanócitos (Dudley et al. 2002). Em 2008 foi utilizado imiquimode (modificador tópico da resposta imune) para neoplasias intraepiteliais vulvares com respostas parciais em 81% dos pacientes tratados (van Seters et al. 2008) até que em 2009 surgiu a primeira vacina contra as oncoproteínas do HPV-16, também com resultados satisfatórios para essa enfermidade (Kenter et al. 2008).

Em 2010, imunoterapia celular autóloga com Sipuleucel T proporcionou aumento de sobrevida global entre homens com câncer de próstata metastático resistente à castração (Kantoff et al. 2010). No mesmo ano, uma nova droga, o ipilimumabe foi aprovada para doentes com melanoma metastático também com benefício de sobrevida global. Tratava-se de um anticorpo específico ao antígeno *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*-CTLA-4, um receptor proteico presente na superfície das células T, cuja interação com a proteína CD80 presente na célula tumoral ou na célula apresentadora de antígeno (APC) inibe a resposta imunológica (Hodi et al. 2008). Consequentemente, os estudos passaram a se direcionar para outras estruturas com repercussão imunológica semelhante, como a *Programmed Cell Death 1 Receptor*-PD-1, cuja interação com sua proteína ligante, a PD-L1, também acarreta uma diminuição da resposta imune.

A suspeita de que a hiperexpressão ou aumento de função de PD-L1 pudesse ser um mecanismo da evasão do sistema imune do hospedeiro pelas células tumorais passou a ser discutida em diversos estudos. Em um deles, foram analisadas 196 amostras tumorais de pacientes com carcinoma de células renais (RCC), e observou-se 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 (Thompson et al. 2004). Em outro estudo semelhante observou-se que pacientes com câncer de ovário com expressão elevada de PD-L1 tiveram sobrevida significativamente menor do que aqueles com baixa expressão (Hamanishi et al. 2007). Além disso, observou-se redução da contagem de linfócitos $TCD8^+$, sugerindo um papel supressor de células $TCD8^+$ exercido por PD-L1.

Em 2015 foi aprovado um imunobiológico denominado nivolumabe para tumores avançados de pulmão com aumento de sobrevida global. A medicação é um anticorpo humanizado IgG4 com ação na proteína *Programmed Cell Death 1 Recepto*-PD-1. Consolidava-se então uma nova etapa na imunoterapia relacionada ao câncer, cujo desenvolvimento tornou-se possível através do estudo da sinapse imunológica. Posteriormente, o ipilimumabe mais o nivolumabe foram aprovados para o tratamento de melanoma metastático, carcinoma avançado de células renais e câncer colorretal metastático (Rotte 2019). Desde então as aplicações e indicações para diversos sítios primários e neoplasias foram aprovadas, inclusive com uso agnóstico em pacientes com instabilidade de microssatélites. No CaPe não há ainda nenhuma indicação aprovada.

1.4 PD-L1 E ÀS PERSPECTIVAS NO CAPE

Udager et al. (2016) relatam a frequente expressão de PD-L1 no carcinoma primário e metastático de pênis, analisado por imunohistoquímica. Este foi o primeiro estudo a relatar a expressão do *checkpoint* imunológico nesta doença e fornece uma justificativa razoável para a aplicação da imunoterapia ao CaPe. Neste estudo de coorte avaliou-se 37 pacientes, tendo em vista, a relativa raridade desta doença no ocidente. No entanto, estudos adicionais são necessários para validar os resultados desses autores. Também relatam forte associação entre a expressão de PD-L1 no tumor primário e a presença de linfonodo metastático. Não há relato de expressão significativa de PD-L1 em células imunes no microambiente tumoral. PD-L1 é um *checkpoint* imunológico que, ao se ligar aos seus receptores programados de morte 1 (PD-1) ou B7-1 nos linfócitos de células T, regula negativamente a função das células T ativadas e outras células do sistema imunológico. Devido ao papel central dos linfócitos T na mediação da imunidade antitumoral adquirida, a expressão de PDL1 no microambiente tumoral pode fornecer mecanismos adicionais para os tumores evitarem a erradicação pelo sistema imunológico do hospedeiro (Dong 2002; Figueiredo 2019).

PD-L1 é ampla e variavelmente expressa em uma vasta gama de neoplasias. Foi demonstrado que o bloqueio da via PD-L1-PD-1 produz benefícios gerais de sobrevida em

câncer de pulmão de não pequenas células, melanoma, carcinoma de células renais e carcinoma urotelial (Dong 2002; Rosenberg et al. 2016; Figueiredo 2019; Rotte 2019). Como tal, pode ser benéfico expandir a aplicação de inibidores do *checkpoint* imunológico a outros tumores para os quais não existem tratamentos efetivos, como o carcinoma peniano avançado ou metastático.

Dados recentes sugerem que os inibidores do *checkpoint* imunológico são mais ativos em tumores com altas taxas de mutação do que naqueles com taxas de mutação mais baixas (Hamid e Carvajal 2013; Garon et al. 2015; Rotte 2019). Em estudo publicado sobre a projeção genômica do carcinoma de células escamosas do pênis na atual análise da expressão de PD-L1, embora não tenham sido encontradas associações significativas entre a expressão de PD-L1 e alterações moleculares específicas, relatam que tendem a associação entre o aumento do número total de alterações moleculares e a expressão de PD-L1 (Udager et al. 2016). Isto contribui em parte para a nossa capacidade limitada de utilizar biomarcadores imunohistoquímicos, uma vez que estes ensaios sofrem variabilidade substancial relacionada as características de desempenho dos anticorpos, falta de padronização de biomarcadores, diretrizes de avaliação e pontos de corte variáveis entre ensaios com diferentes anticorpos anti-PD-L1 (Apolo 2015; Netto 2016). É importante, portanto, continuar explorando aspectos de pesquisas e aplicações clínicas baseadas em PD-L1 em estudos futuros, especialmente sabendo que alguns pacientes ainda se beneficiam do direcionamento de PD-L1 apesar da falta de expressão do tumor ou das células imunes infiltrantes. Maiores respostas têm sido observadas em pacientes cujos tumores tinham níveis mais altos de expressão de PD-L1 por células imunes no microambiente tumoral, uma descoberta que poderia ser preditiva de maiores taxas de resposta à terapia anti-PD-L1 (Powles et al. 2014; Rosenberg et al. 2016). No geral, as conclusões de Udager et al. (2016) são encorajadoras e, uma vez substanciados por estudos semelhantes, podem fornecer a base para ensaios clínicos para avaliar o benefício dos inibidores do ponto de verificação imune anti-PD-1 e anti-PD-L1 em pacientes com carcinoma peniano avançado ou metastático

2 JUSTIFICATIVA

Estudos em diferentes tumores buscam avaliar a expressão imunohistoquímica de anti-PD-L1, com intento de direcionar à uma melhor abordagem terapêutica, todavia, pouco se conhece sobre a expressão de PD-L1 em carcinomas de pênis.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar por imunohistoquímica a frequência da expressão de PD-L1 nas células tumorais e no microambiente em carcinomas de pênis

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 Determinar a imunoexpressão de PD-L1 em células tumorais e linfócitos em pacientes com CaPe;

2 Analisar a associação entre a positividade de PD-L1 em células tumorais e no micromabiente tumoral, avaliando as células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) com células que apresentem imunoexpressão para CD4, CD8 e CD20;

3 Avaliar a associação entre a imunoexpressão de PD-L1 com as características clínico-patológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto tem como desenho o estudo de coorte longitudinal, retrospectivo e está aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (Plataforma Brasil) sob número CAAE - 44832015.2.0000.5205. A amostra é oriunda do Hospital de Câncer de Pernambuco, sendo 57 (cinquenta e sete) blocos parafinados de tumores de pênis de diferentes pacientes, atendidos entre os anos de 1960 e 2018. As lâminas histológicas respectivas de cada bloco, foram confeccionadas, coradas por Hematoxilina e Eosina (HE), e os laudos histopatológicos foram revisados pelo Prof. Dr. Fernando Augusto Soares.

Pacientes sem informações suficientes ou que o material em parafina fosse exíguo ou inviável foram excluídos da amostra de estudo.

Foram incluídos pacientes com informações sobre o diagnóstico e epidemiologia de interesse para o presente estudo (idade, estado civil, raça, tipo de cirurgia e data da cirurgia, etc.) e os dados histopatológicos de interesse (tipo e grau histológico e presença de êmbolos vasculares e status linfonodal).

Após a seleção dos casos e levantamento dos blocos parafinados, foi submetido ao "*Tissue microarray*" (TMA). Em seguida foi realizas a imunohistoquímica com o anticorpo primário PD-L1 (clone SP263 Ventana [SpringBio-ECD] EUA), CD4, CD8 e CD20 e revelação por meio de anticorpo secundário, segundo o fabricante.

Tabela 1 – Anticorpos primários, clones, fabricantes, padrão de coloração e células coradas.

Anticorpo	**Clone**	**Fabricante**	**Padrão**	**Célula de interesse**
PD-L1	SP263	Roche	membrana	célula tumoral, linfócitos e macrófagos
CD4	4B12	Novocastra	membrana	linfócitos T *helper*
CD8	1A5	Novocastra	membrana	linfócitos T citotóxico
CD20	L26	Dako	membrana	linfócito B

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE, não se aplica, pois os dados e materiais utilizados neste projeto são oriundos de projetos anteriores, aprovados pelo CEP e devidamente isentados da obrigatoriedade do mesmo. Além disso, vale ressaltar que

muitos dos pacientes não são possíveis de localizar, devido a mudança de endereço, telefone ou óbito.

4.2 RISCOS E BENEFÍCIOS AOS PACIENTES VOLUNTÁRIOS DA PESQUISA

Pacientes voluntários a este projeto de pesquisa não estão sujeitos a nenhum risco direto ou indireto. Porém, quanto aos benefícios, não ocorrerão de forma direta, mas haverá benefícios de forma indireta uma vez que as informações obtidas por meio deste, poderão beneficiar outrem.

4.3 PROTOCOLO DE REAÇÕES

O bloco de TMA foi cortado no micrótomo rotativo na espessura de 5 μm. Colocou-se o *tape* contra o bloco de TMA e cortou-o. O *tape* com o material foi colado na lâmina apropriada e com a pressão manual de um rolo o *tape* foi fixado na lâmina. A lâmina com o *tape* sofreu irradiação com ultravioleta (UV) por 30 min, sendo em seguida mergulhada em solução solvente (TPC) e seca a temperatura ambiente. Os *tapes* foram retirados após a secagem. As lâminas sofreram banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em *freezer*.

A desparafinização foi realizada por 24 horas em estufa 60º C. Posteriormente as lâminas foram banhadas em xilol a 60º C por 20 minutos/xilol à temperatura ambiente por 20 minutos/etanol 100% 30 segundos/ etanol 85% 30 segundos e etanol 70% 30 segundos. As lâminas foram lavadas em água destilada corrente.

Uma solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 foi fervida em panela de pressão (Eterna , Nigro) destampada, as lâminas mergulhadas e a panela lacrada com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula de segurança foi abaixada até a pressurização total. Quatro minutos foram cronometrados após esse sinal. A panela fechada foi deixada sob água corrente até a despressurização total destampada e as lâminas lavadas em água destilada corrente.

Foi então realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H2O2 3%, (água oxigenada 10 vol) com 3 trocas de 10 minutos cada e lavadas em água corrente e destilada

com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré estabelecido, conforme o fabricante, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN3) 0,1%, por 18 horas a 4ºC em câmara úmida, os anticorpos primários, clones, fabricante, padrão de coloração e tipos de células estão elencados na tabela 1.

4.4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para interpretação da imunohistoquímica com o marcador PD-L1 (clone SP263 Ventana [SpringBio-ECD] EUA) em microscopia óptica em campo de grande ampliação (CGA) (400 vezes), considerou-se marcações positivas as células de interesse, ou seja, células tumorais (CT) e/ou células inflamatórias sendo estas: macrófagos e linfócitos, que apresentassem coloração acastanhada em membranas. Esta imunoexpressão foi definida utilizando-se a porcentagem de células de interesse marcadas, sendo considerada negativo, a imunoexpressão presente em <1% das células de interesse; positivo 1+ (uma cruz) a imunoexpressão presente em 1 a <5% das células de interesse; positivo 2+ imunoexpressão em 5 a <50% das células de interesse; positivo 3+ imunoexpressão em 50% ou mais das células de interesse (Apolo 2016; Deng et al. 2016; Torlakovic et al. 2020).

Já para a intepretação da imunohistoquímica com o marcador CD4+ (clone 4B12 Novocastra, Alemanha) em microscopia óptica em CGA, considerou-se marcações positivas em linfócitos que apresentassem coloração acastanhada em membranas. O resultado foi definido utilizando como parâmetro as porcentagens de linfócitos marcados, sendo negativa, a imunoexpressão presente em <10 de células por CGA; positiva 1+ com imunoexpressão presente entre 10 e 50 células por CGA; positivo 2+ com imunoexpressão positiva em >50 células por CGA (Vassallo et al. 2015).

Quanto a avaliação da imunohistoquímica para o marcador CD8+ (clone 1A5 Novocastra, Alemanha) em microscopia óptica em CGA, considerou-se marcações positivas em linfócitos que apresentassem coloração acastanhada em membranas. Como parâmetro as porcentagens de linfócitos marcados, sendo negativa, a imunoexpressão presente em <10 de células por CGA; positiva 1+ com imunoexpressão presente entre 10 e 50 células por CGA; positivo 2+ com imunoexpressão positiva em >50 células por CGA (Vassallo et al. 2015).

Em relação a interpretação da imunohistoquímica com o marcador CD20 (clone L26 Dako, Carpinteria, CA, EUA) em microscopia óptica em CGA, considerou-se marcações positivas os linfócitos que apresentassem coloração acastanhada em membranas, sendo negativa a imunoexpressão presente em <10 de células por CGA; positiva 1+ com imunoexpressão presente entre 10 e 50 células por CGA; positivo 2+ com imunoexpressão positiva em >50 células por CGA (Vassallo et al. 2015).

Foi utilizado um formulário para coleta de dados clínicos e anátomo patológicos. Os dados obtidos a partir da expressão imunohistoquímica dos marcadores PD-L1, CD4, CD8 e CD20 foram transcritos diretamente para uma planilha de Excel.

Foi criado um banco de dados em *Software R* (versão 3.5) com as características dos doentes, incluindo-se os dados do formulário e planilha.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os diversos dados obtidos foram tabulados em uma planilha de dados Excel e analisados utilizando os programas *Action Stat* e *R* (versão 3.5). Para verificar a análise de associação entre pares de variáveis qualitativas (categóricas) foi utilizado o teste Exato de *Fisher*. Um $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises.

5 RESULTADOS

A amostra é oriunda do Hospital de Câncer de Pernambuco, de pacientes atendidos entre os anos de 1960 e 2018, sendo inicialmente incluídas 57 (cinquenta e sete) amostras com diagnósticos de câncer de pênis viáveis ao estudo. Contudo, havia falta de informação clínico-patológicos em cinco casos, sendo estes removidos da amostragem, permanecendo viáveis 52 (cinquenta e duas) amostras. Durante o procedimento de preparação das imunohistoquímicas três amostras parafinadas foram exíguas e retiradas, restando 49 amostras.

Desta forma, a amostra foi composta por 49 pacientes, com média de idade de 69 anos e desvio-padrão de 12 anos.

Para caracterização clínico-patológica amostral foi construída a tabela a seguir.

Tabela 2 - Dados clínicos e patológicos dos 49 pacientes

VARIÁVEL	CATEGORIAS	FREQUÊNCIA (n)	%
ESTADO CIVIL	SOLTEIRO	13	26,6%
	CASADO	27	55,1%
	SEPARADO	1	2,0%
	VIÚVO	2	4,1%
	OUTROS	6	12,2%
PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	BIÓPSIA	9	18,4%
	POSTECTOMIA	3	6,1%
	PENECTOMIA PARCIAL	30	61,2%
	PENECTOMIA TOTAL	4	8,2%
	PENECTOMIA	2	4,1%
	PENECTOMIA DISTAL	1	2,0%
ESVAZIAMENTO LINFONODAL	SIM	14	28,6%
	NÃO	35	71,4%
	NÃO INFORMADO	5	10,2%
	GLANDE	24	49,0%
	CORPO	5	10,2%

Cont/ Tabela 2

VARIÁVEL	CATEGORIAS	FREQUÊNCIA (n)	%
LOCALIZAÇÃO TUMORAL	PREPÚCIO	6	12,2%
	GLANDE E PREPÚCIO	4	8,2%
	GLANDE E CORPO	3	6,1%
	GLANDE, PREPÚCIO E CORPO	2	4,1%
HISTOLOGIA	USUAL	31	64,6%
	VERRUCOSO	7	14,6%
	WARTY	3	6,3%
	WARTY/BASALOIDE	2	4,2%
	VERRUCOSO E PSEUDOGLANDULAR	2	4,2%
	USUAL E SARCOMATOIDE	1	2,1%
	VERRUCOSO E USUAL	1	2,1%
	BASALOIDE	1	2,1%
GRAU HISTOLÓGICO	1	2	6,1%
	2	23	69,7%
	3	8	24,2%
BORDAS	GRANDES BLOCOS	17	34,7%
	PEQUENOS BLOCOS	18	36,7%
	PUSHING	7	14,3%
	MICROINVASIVO	3	6,1%
	MORFEIA	1	2,0%
	NA (não avaliável)	2	4,1%
INV CPESP	SIM	40	81,6%
	NÃO	5	10,2%
	NA (não avaliável)	3	6,1%
			0,0%
INV CPCAV	SIM	16	32,7%
	NÃO	28	57,1%
	NA (não avaliável)	4	8,2%
			0,0%
INV URETRA	SIM	1	2,0%
	NÃO	37	75,5%
	NA (não avaliável)	10	20,4%
			0,0%
INV VASCULAR	SIM	0	0,0%
	NÃO	44	89,8%
	NA (não avaliável)	4	8,2%
			0,0%
	SIM	15	30,6%

Cont/ Tabela 2

VARIÁVEL	CATEGORIAS	FREQUÊNCIA (n)	%
INV PERINEURAL	NÃO	29	59,2%
	NA (não avaliável)	4	8,2%
PEIN	DIFERENCIADO	22	44,9%
	BASALOIDE	2	4,1%
	WARTY/BASALOIDE E BASALOIDE	1	2,0%
	NA (não avaliável)	22	44,9%
	WARTY	2	4,1%
LÍQUEN	SIM	21	42,9%
	NÃO	22	44,9%
	NA (não avaliável)	6	12,2%
HIPERPLASIA	SIM	25	51,0%
	NÃO	18	36,7%
	NA (não avaliável)	6	12,2%
COILOCITO	SIM	12	24,5%
	NÃO	36	73,5%
	NA (não avaliável)	1	2,0%

Legenda: (INV CPESP) invasão pela neoplasia em corpo esponjoso; (INV CPCAV) invasão pela neoplasia em corpo cavernoso; (PEIN) neoplasia intraepitelial peniana.

Em relação ao estado civil 27 (55,1%) dos pacientes eram casados 13 (26,6%) solteiros, 6 (12,2%) outros 2 (4,1%) viúvos e 1 (2%) separado.

Quanto ao procedimento cirúrgico, em 30 (61,2%) pacientes, procedida a penectomia parcial, 9 (18,4%) biópsia, 4 (8,2%) penectomia total, 3 (6,1%) postectomia 2 (4,1%) penectomia e 1 (2%) a penectomia distal.

O esvaziamento linfonodal foi realizado em 35 (71,4%) pacientes e não esvaziados 14 (28,6%) pacientes.

Já a localização do tumor, em 24 (49%) na glande, 6 (12,2%) prepúcio, em corpo e não informado 5 (10,2%) pacientes em cada, em 4 (8,2%) glande e prepúcio, 3 (6,1%) glande corpo e 2 (4,1%) pacientes em glande, prepúcio e corpo.

Sobre a variável histologia, 31 (64,6%) usual, 7 (14,6%) verrucoso, 3 (6,3%) warty 2 (4,2%) warty/basaloide 2 (4,2%) verrucoso e pseudoglandular 1 (2,1%) usual e sarcomatoide 1 (2,1%) verrucoso e usual e 1 (2,1%) basaloide.

O grau 2 histológico ocorreu em 23 (69,7%) dos pacientes, o grau 3 em 8 (24,2%) e grau 1 em 2 (6,1%) pacientes.

A invasão das bordas revelou em pequenos blocos em 18 (36,7%) pacientes, em grandes blocos em 17 (34,7%), em *pushing* 7 (14,3%), microinvasivo em 3 (6,1%), em morfeia 1 (2%) e não avaliável em 2 (4,1%) dos pacientes.

Invasão em corpo esponjoso pela neoplasia ocorreu em 40 (81,6%) e não ocorreu em 5 (10,2%) pacientes.

A invasão em corpo cavernoso pela neoplasia não ocorreu em 28 (57,1%), ocorreu em 16 (32,7%) e não foi avaliado em 3 (6,1%) dos pacientes.

Quanto a invasão da uretra pela neoplasia não ocorreu em 37 (75,5%), não foi avaliada em 10 (20,4%) e ocorreu em 1 (2%) paciente.

Invasão vascular não estava presente em 44 (89,8%) e não foi avaliada em 4 (8,2) pacientes.

Invasão perineural não presente em 29 (59,2%), presente em 15 (30,6%) e não avaliada em 4 (8,2%) pacientes.

A neoplasia intraepitelial peniana diferenciada em 22 (44,9%), não avaliada em 22 (44,9%), basaloide em 2 (4,1%), warty em 2 (4,1%) e warty/basaloide em 1 (2%) paciente.

Líquen não presente em 22 (44,9%), presente em 21 (42,9%) e não avaliável em 6 (12,2%) pacientes.

Hiperplasia em 25 (51%) pacientes, ausente em 18 (36,7%) e não avaliável em 6 (12,2%) pacientes.

Ausência de coilócito em 36 (73,5%), presente em 12 (24,5%) e não avaliável em 1 (2%) paciente.

A Figura 1 refere-se a imunoexpressão de PD-L1 apresentada a seguir.

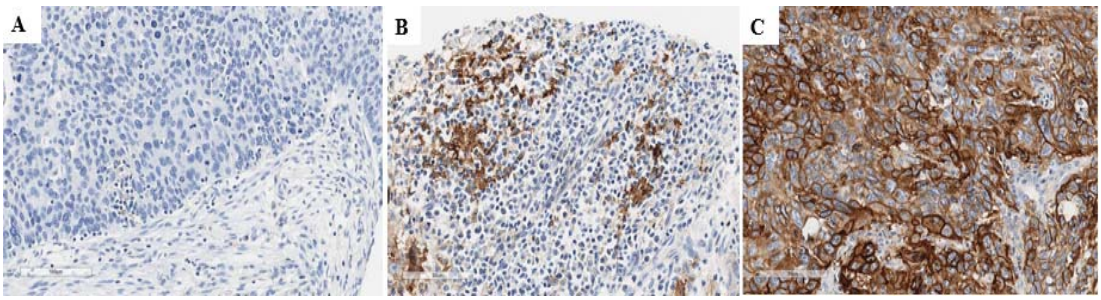


Figura 1 - Imunoexpressão de PD-L1. **(A):** Ausência de imunoexpressão de PD-L1 em células tumorais (CT) e células inflamatórias (CI), ou seja, macrófagos e linfócitos. **(B):** Imunoexpressão de PD-L1 (clone 263) 2+ em CI. **(C):** Imunoexpressão de PD-L1 (clone 263) 3+ em CT Todas as figuras estão em resolução maior em anexo.

A Figura 2, atinente a imunoexpressão de CD4, CD8 e CD20 é evidenciada a seguir.

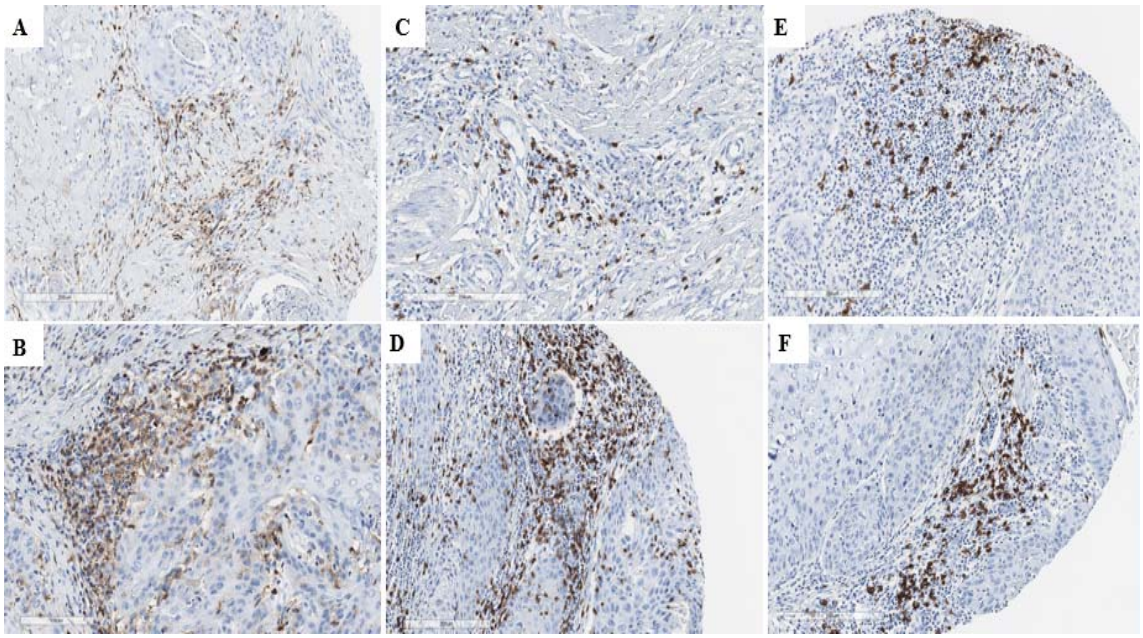
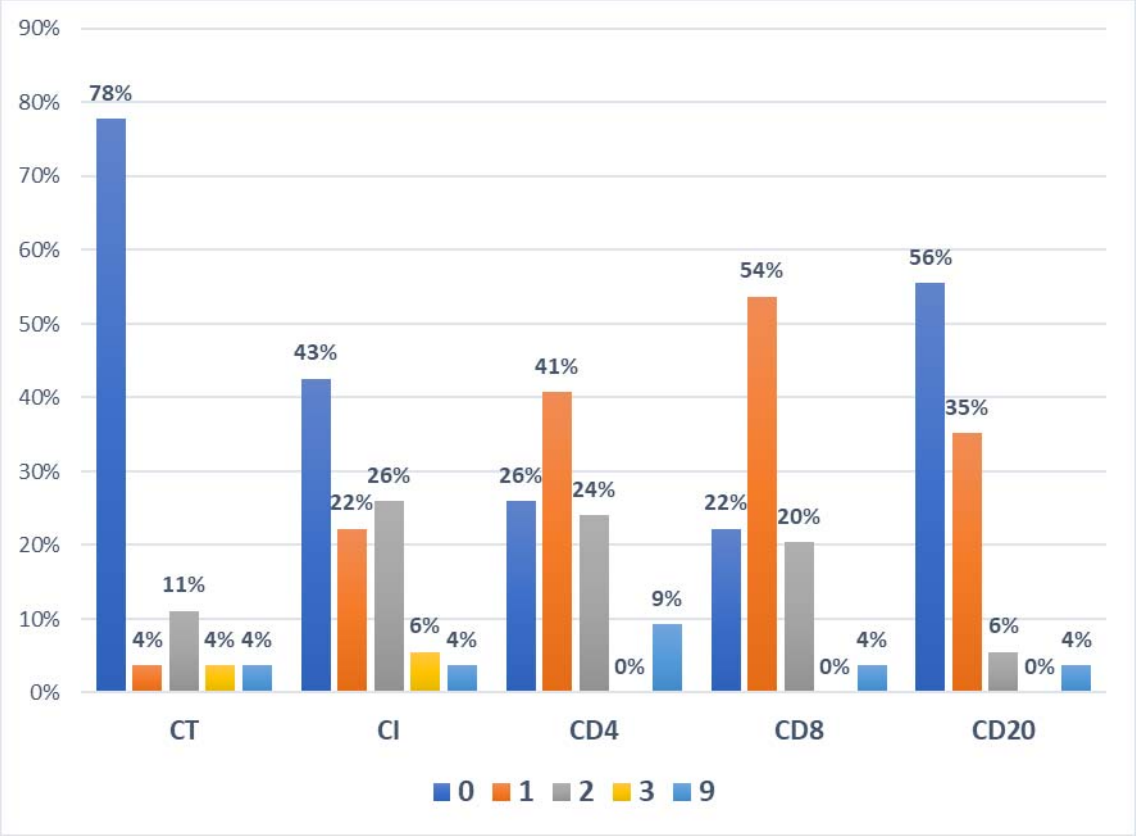


Figura 2 - Imunoexpressão de CD4, CD8 e CD20. **(A):** Imunoexpressão de CD4 1+. **(B):** Imunoexpressão de CD4 2+. **(C):** Imunoexpressão de CD8 1+. **(D):** Imunoexpressão de CD8 2+. **(E):** Imunoexpressão de CD20 1+. **(F):** Imunoexpressão de CD20 2+.

Sendo assim, foram analisadas as células de interesse, ou seja, células tumorais (CT) e células inflamatórias (CI) em microscopia óptica, em campo de grande ampliação (CGA), que apresentaram expressão, ou seja, coloração acastanhada em membranas, conforme metodologia e exemplificados nas imagens A, B e C. A seguir a distribuição dos resultados de PD-L1, CD4, CD8 e CD20:



Legenda: Score (0) <1% das células de interesse; Score (1) 1 a <5% das células de interesse; Score (2) 5 a <50% das células de interesse; Score (3) 50% ou mais das células de interesse; Score (9) Não avaliável. PD-L1 (célula tumoral = CT, célula inflamatória = CI [macrófagos e linfócitos]).

Figura 3 – Distribuição dos resultados de PD-L1 (célula tumoral = CT, célula inflamatória = CI), CD4, CD8 e CD20.

A expressão de PD-L1 apresentou score zero em 78%, score dois em 11%, score um em 4%, score três em 4%, score nove em 4% das células tumorais (CT).

Em células inflamatórias (CI = [macrófagos e linfócitos]), a expressão de PD-L1 foi score zero em 43% das células, score dois em 26%, score um em 22%, score três em 6% e score nove em 4%.

Expressão score um de CD4 ocorreu em 41% dos linfócitos, de score zero em 26%, de dois em 24% e de score nove em 9% dos linfócitos.

Quanto a expressão de CD8 foi score um em 54% dos linfócitos, score zero em 22%, score três em 20% e score nove em 4% dos linfócitos.

Sobre a expressão de CD20, foi score zero em 56%, score um em 35%, score dois em 6% e score nove em 4% dos linfócitos.

Para comparar os resultados de PD-L1, CD4, CD8 e CD20 foi utilizado o Teste Exato de *Fisher*. Segue a tabela com os respectivos resultados:

Tabela 3 – Teste Exato de *Fisher* para expressão de PD-L1 (célula tumoral = CT, célula inflamatória = CI) e CD4, CD8 e CD20.

CRUZAMENTOS	***p-VALOR***
CT X CD4	*0,0094
CT X CD8	0,1128
CT X CD20	*0,0047
CI X CD4	*0,0003
CI X CD8	0,3655
CI X CD20	*0,00006

*Resultados significativos = *p*-valor ≤ 0,05.
Legenda: PD-L1 = célula tumoral (CT); célula inflamatória (CI) = macrófagos e linfócitos. Dados brutos para compilação desta tabela encontram-se em anexo.

A partir do Teste Exato de *Fisher* foi possível verificar valores associados, ao nível de significância de 5%, quanto a CT *vs* CD4 (p=0,0094), CT *vs* CD20 (p=0,0047), CI *vs* CD4 (p=0,0003) e CI *vs* CD20 (p=0,00006). Não foi observado valores significativos entre CT *vs* CD8 e CI *vs* CD8.

Avaliou-se também a associação de imunoexpressão de PD-L1 com os dados clínico-patológicos que se apresentam a seguir.

Tabela 4 – Teste Exato de *Fisher* para PD-L1 com os dados clínico-patológicos.

CRUZAMENTOS	***p-VALOR***
CT X CIRURGIA	0,2300
CT X ESVAZIAMENTO	0,7995
CT X LOCALIZAÇÃO	0,3572
CT X HITOLOGIA	0,9177
CT X GRAU	0,1962
CT X BORDAS	0,0826
CT X INV CPESP	0,0925
CT X INV CPCAV	0,1393
CT X INV URETRA	0,4122
CT INV VAS	0,2213
CT X INV PERINEURAL	0,3826
CT X INDEX FINAL	0,4955
CT X PEIN	0,1901
CT X LÍQUEN	0,2542
CT X HIPERPLASIA	0,5704
CT X COILOCITO	0,2814
CI X CIRURGIA	0,3807
CI X ESVAZIAMENTO	0,9811

Cont/ Tabela 4

CRUZAMENTOS	***p-VALOR***
CI X LOCALIZAÇÃO	0,2332
CI X HITOLOGIA	0,4882
CI X GRAU	0,4015
CI X BORDAS	0,1729
CI X INV CPESP	0,1678
CI X INV CPCAV	0,1564
CI X INV URETRA	0,6782
CI INV VAS	0,2689
CI X INV PERINEURAL	0,1574
CI X INDEX FINAL	0,1246
CI X PEIN	0,1919
CI X LÍQUEN	0,2159
CI X HIPERPLASIA	0,4882
CI X COILOCITO	0,5406

Legenda: (INV CPESP) invasão pela neoplasia em corpo esponjoso; (INV CPCAV) invasão pela neoplasia em corpo cavernoso; (PEIN) neoplasia intraepitelial peniana. Dados brutos para compilação desta tabela encontram-se em anexo.

Não foi encontrada nenhuma associação, ao nível de significância de 5%, entre os dados de imunoexpressão de PD-L1, seja em células tumorais ou inflamatórias, em relação aos dados clínico-patológicos.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que cerca de um quinto dos pacientes testados apresentaram imunoexpressão para PD-L1 em células neoplásicas e em mais da metade houve expressão em macrófagos e linfócitos do microambiente tumoral. Observamos também a associação da imunoexpressão de PD-L1 com a presença de células CD4 (linfócitos T helper) e CD20 (células B), do microambiente tumoral. No entanto, não observamos associação entre a PD-L1 e células CD8, Quando comparamos a imunoexpressão de PD-L1 com os dados clínicos-patológicos, não observamos valores significativos.

Não encontramos estudos que tenham feito a avaliação concomitante de PD-L1 com os marcadores CD4, CD8 e CD20 em câncer de pênis. Acreditamos que nosso estudo seja o pioneiro nesta abordagem. Agahozo et al. (2020) buscou identificar o papel dos linfócitos infiltrantes de tumores (TIL) imunomarcados por CD4, CD8 e CD20 em carcinomas ductal da mama e verificar sua associação quanto a expressão de PD-L1 utilizando dois clones SP142 e SP263, nos casos com alta densidade de TIL. A expressão de PD-L1 (SP142) em células tumorais foi associada ao subtipo tumoral, no entanto, apenas o clone SP142 apresentou resultados significativos.

Todavia, evidenciamos que há expressão de PD-L1 em células tumorais e inflamatórias. Estas informações foram também verificadas num estudo de coorte com cerca de 220 pacientes com câncer de pênis. Observou-se que 32,1% dos tumores e 64,2% de TIL expressavam PD-L1. Além disso, elucidou-se que pacientes com positividade para PD-L1 em células tumorais e TIL demonstravam risco significativo de menor sobrevida específica para câncer e que o valor prognóstico da expressão de PD-L1 apresentou maior positividade nas células tumorais (Davidsson et al. 2019).

No presente estudo não observamos associação entre PD-L1 e variáveis clínico-patológicas, dentre elas a de maior relevância a presença de metástases em linfonodos regionais, porém existem dados que apontam que a maior expressão de PD-L1 em células tumorais esteja relacionada a maior risco de metástases linfonodal e pior prognóstico (Udager et al. 2016).

de Vries et al. (2019) observou em carcinomas de pênis, que alta expressão de PD-L1 e a infiltração de células T CD8 + , relacionando tais achados, em especial este último a uma

possível resposta a imunoterápicos, porém em nosso estudo não observamos tal associação de PD-L1 com CD8.

A presença de TIL CD4, CD8, CD20 e a célula T regulatória (Treg) que tem imunoexpressão para Forkhead box P3 (FoxP3), já foi demonstrada por nós em carcinomas de pênis, bem como, o seu valor significativo de FoxP3 para pior sobrevida destes pacientes (Vassallo et al. 2015). O presente estudo incrementa informações acerca do potencial desenvolvimento do padrão efetor de Treg. Há evidências de que a expressão de PD-L1 esteja relacionada diretamente com a ativação de Tregs no microambiente tumoral (Wang et al. 2020). PD-L1 é uma proteína transmembranar com a capacidade de suprimir o sistema imunológico do hospedeiro, causando anergia da resposta imune antitumoral, com efeito, podem estimulam o padrão efetor Treg (Diskin et al. 2020).

Nossos achados podem fomentar o uso de imunoterapia contra PD-L1 para pacientes com câncer de pênis, selecionados por imunohistoquímica. Esta abordagem imunoterapêutica já tem sido amplamente utilizada em outros tumores como gastrointestinais, pulmonares e genitourinários (Herbst et al. 2016; Xie et al. 2019). Recentemente foi aprovado o uso de um anticorpo anti-PD-L1, o KEYTRUDA® (pembrolizumab) para câncer de colo uterino. Os estudos que subsidiaram esta aprovação mostram frequência de imunoexpressão de PD-L1 na média de vinte por cento das amostras estudadas (Karpathiou et al. 2019), semelhantes a verificada por nós nas células tumorais de carcinoma de pênis. Atualmente há em andamento vários ensaios clínicos de imunoterapia em pacientes com câncer de pênis, com diferentes anticorpos.

Nossos achados concluem que por imunohistoquímica PD-L1 foi expresso em cerca de um quinto dos casos e se associou a uma resposta imune anérgica. Embora expresso na minoria dos casos, a capacidade da célula neoplásica ter o inibidor de check-point com o mecanismo de evasão da resposta imune levanta a possibilidade de se testar a imunoterapia como estratégia terapêutica em casos selecionados.

6 CONCLUSÕES

1 Em células tumorais de CaPe há imunoexpressão de PD-L1 em cerca de um quinto dos casos amostrados;

2 Há associação entre a expressão de PD-L1 nas células neoplásicas e o número de células CD4 e CD20 no microambiente tumoral;

3 Não há associação entre a expressão de PD-L1 nas células neoplásicas com a densidade do infiltrado linfocitário CD8 positivo;

4 Não há associação entre a expressão de PD-L1 pelas células neoplásicas e os parâmetros clínico-patológicos avaliados.

7 REFERÊNCIAS

Agahozo MC, van Bockstal MR, Groenendijk FH, van den Bosch TPP, Westenend PJ, van Deurzen CHM. Ductal carcinoma in situ of the breast: imune cell composition according to subtype. Mod Pathol. 2020;33(2):196-205.

Apolo AB. PDL1: The illusion of an ideal biomarker. Eur Urol Focus. 2016;1(3):269-71.

Assis MC, Campos AH, Oliveira JS, Soares FA, Silva JM, Silva PB, et al. Increased expression of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells correlates with Epstein Barr virus and has no impact on survival in patients with classical Hodgkin lymphoma in Brazil. Med Oncol. 2012;29(5):3614-9.

Ayala GE, Cubilla AL, Lopes A, Guimarães GC, Oliveira ML, Velázquez EF, et al. Perineural invasion (PNI) predicts mortality in penile squamous cell carcinoma: a long-term outcome study comparing clinico-pathologic features. J Urol. 2009; 181(suppl 4):327.

Backes DM, Kurman RJ, pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. Cancer Causes Control 2009;20(4):449-57.

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. 2001;91(12):2315-21.

Bleeker MCG, Heideman DAM, Snijders PJF, Horemblas S, Dillner J, Meijer CJLM. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. World J Urol. 2009;27(2):141-50.

Brumini R. Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-1980. Brasília: Ministério da Saúde; 1982.

Campos MM, de Souza MH, Pires V, Scheiner MA, Esteves EB, Ornellas AA. Clinical implications of natural killer cytotoxicity in patients with squamous cell carcinoma of the penis. Nat Immun. 1998;16(5-6):256-62.

Coblentz TR, Theodorescu D. Morbidity of modified prophylactic inguinal lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. J Urol. 2002;168((4 Pt 1):1386-9.

Coelho RWP, Pinho JD, Moreno JS, Garbis DVEO, do Nascimento AMT, Larges JS, et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? BMC Urol. 2018;18(1):50.

Crawshaw JW, Hadway P, Hoffland D et al. Sentinel lymph node biopsy using dynamic lymphoscintigraphy combined with ultrasound-guided fine needle aspiration in penile carcinoma. Br J Radiol. 2009; 82(973):41-8.

Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Roveros M. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. Am J Surg Pathol. 1993;17(8):753-63.

Cubilla AL, Velazquez EF, Reuter VE, Oliva E, Mihm MC, Young RH. Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of “verruciform” penile tumors. Am J Surg Pathol. 2000;24(4):505-12.

Cubilla AL, Dillner J, Schellhamer PF, Horenblas S, Ayala AG, Reuter VE, et al. Malignant epithelial tumors. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, editors. Tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: WHO, IARC Press; 2004. p.281-96.

Cubilla A. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. World J Urol. 2009;27(2):169-77.

Cunha IW, Guimarães GC, Soares F, Velazquez E, Torres JJ, Chaux A, et al. Pseudoglandular (adenoid, acantholytic) penile squamous cell carcinoma: clinicopathologic and outcome study of 7 patients. Am J Surg Pathol. 2009; 33(4):551-5.

Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. Clinics (Sao Paulo). 2012;67(5):483-8.

Davidsson S, Carlsson J, Giunchi F, Harlow A, Kirrander P, Rider J, et al. PD-L1 Expression in men with penile cancer and its association with clinical outcomes. Eur Urol Oncol. 2019;2(2):214-221.

Deng C, Li Z, Guo S, Chen P, Chen X, Zhou Q, Chen J, et al. Tumor PD-L1 expression is correlated with increased TILs and poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. Oncoimunologia. 2016;6(2):e1269047.

Diskin B, Adam S, Cassini MF, Sanchez G, Liria M, Aykut B, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. Nat Immunol. 2020;21(4): 442-54.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al.Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med. 2002;8(8):793-800.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. J Immunother. 2002;25(3):243-51.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio JBS, Glina S. Epidemiologic study of penile cancer in Brazil. Int Braz j Urol. 2008; 34(5):587-93.

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, Cerruto MA, Novara G, Cavalleri S, et al. Predictive pathological factors of lymph nodes involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. Int Urol Nephrol. 2002;34(2):245-50.

Figueiredo CRLV. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. J Bras Patol Med Lab. 2019;55(3):321-32.

Garon EB. Current perspectives in immunotherapy for non-small cell lung cancer. Semin Oncol. 2015;42 Suppl 2:S11-8.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RSM, Zequi SC, Leal MLO, Carvalho AL, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastasis. Urology. 2006; 68(1):148-53.

Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, 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(9):3360-5.

Hamid O, Carvajal RD. Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. Expert Opin Biol Ther. 2013;13(6):847-61.

Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. Lancet. 2016;387(10027):1540-50.

Hersey P, Bindon C, Edwards A, Murray E, Phillips G, McCarthy WH. Induction of cytotoxic activity in human lymphocytes against autologous and allogeneic melanoma cells in vitro by culture with interleukin 2. Int J Cancer. 1981;28(6):695-703.

Heyns CF, Theron PD. Evaluation of dynamic sentinel lymph node biopsy in patients with squamous cell carcinoma of the penis and palpable inguinal nodes. BJI Int. 2008;102(3):305-9.

Hodi FS, Oble DA, Drappatz J, Velazquez EF, Ramaiya N, Ramakrishna N, et al. CTLA-4 blockade with ipilimumab induces significant clinical benefit in a female with melanoma metastases to the CNS. Nat Clin Pract Oncol. 2008;5(9):557-61.

Horenblas S. Lymphadenectomy for squamous cell carcinomaof the penis. Part 1: diagnosis of lymph node metastasis. BJU Int. 2001;88(5):467-72.

Jensen JB, Jensen KME, Ulhoi BP, Nielsen SS, Lundbeck F. Sentinel lymph-node biopsy in patients with squamous cell carcinoma of the penis. BJU Int. 2009;103(9):1199-203.

Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. N Engl J Med. 2010;363(5):411-22.

Karpathiou G, Chauleur C, Mobarki M, Peoc'h M. The immune checkpoints CTLA-4 and PD-L1 in carcinomas of the uterine cervix. Pathol Res Pract. 2020;216(1):152782.

Kawaida H, Kono K, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. J Surg Res. 2005;124(1):151-7.

Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, et al. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. Clin Cancer Res. 2008;14(1):169-77.

Kirkwood JM, Ernstoff M. Melanoma: therapeutic options with recombinant interferons. Semin Oncol. 1985;12(4 Suppl 5):7-12.

Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, et al.. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. Clin Cancer Res. 2007;13(3):902-11.

Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4(+)CD25 high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. Cancer Immunol Immunother. 2006;55(9):1064-71.

Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ, Renard N, Lejeune FJ. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. J Clin Oncol. 1992;10(1):52-60.

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

McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. Iowa Orthop J. 2006;26:154-8.

Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. Lancet Oncol 2004;5(4):240-7.

Morales A, Cohen Z. Mycobacterium phlei cell wall-nucleic acid complex in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer unresponsive to bacillus Calmette-Guerin. Expert Opin Biol Ther. 2016;16(2):273-83.

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

Netto GJ. Role for anti-PD-L1 immune checkpoint inhibitor in advanced urothelial carcinoma. Lancet. 2016;387(10031):1881-2.

Ono Y, Ozawa M, Tamura Y, Suzuki T, Suzuki K, Kurokawa K, et al. Tumor-associated tissue eosinophilia of penile cancer. Int J Urol. 2002;9(2):82-7.

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.

Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. Nature. 2014;515(7528):558-62.

Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. Lancet. 2016;387(10031):1909-20.

Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. J Exp Clin Câncer Res. 2019;38(1):255.

Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, 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(49):17174-9.

Torlakovic E, Lim HJ, Adam J, Barnes P, Bigras G, Chan AWH, et al. "Interchangeability" of PD-L1 immunohistochemistry assays: a meta-analysis of diagnostic accuracy. Mod Pathol. 2020;33(1):4-17.

Udager AM, Liu TY, Skala SL, Magers MJ, McDaniel AS, Spratt DE, et al. Frequent PD-L1 expression in primary and metastatic penile squamous cell carcinoma: potential opportunities for immunotherapeutic approaches. Ann Oncol. 2016;27(9):1706-12.

van Seters M, van Beurden M, ten Kate FJ, Beckmann I, Ewing PC, Eijkemans MJ, et al. Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod. N Engl J Med. 2008;358(14):1465-73.

Vassallo J, Rodrigues AF, Campos AH, Rocha RM, da Cunha IW, Zequi SC, et al. Pathologic and imunohistochemical characterization of tumoral inflammatory cell infiltrate in invasive penile squamous cell carcinomas: Fox-P3 expression is an independent predictor of recurrence. Tumour Biol. 2015;36(4):2509-16.

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, Ayala G, Liu Hm, Chaux A, Zanotti M, Tores J, et al. Histologic grade and perineural invasion is more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10mm. Am J Surg Pathol. 2008;32(7):974-9.

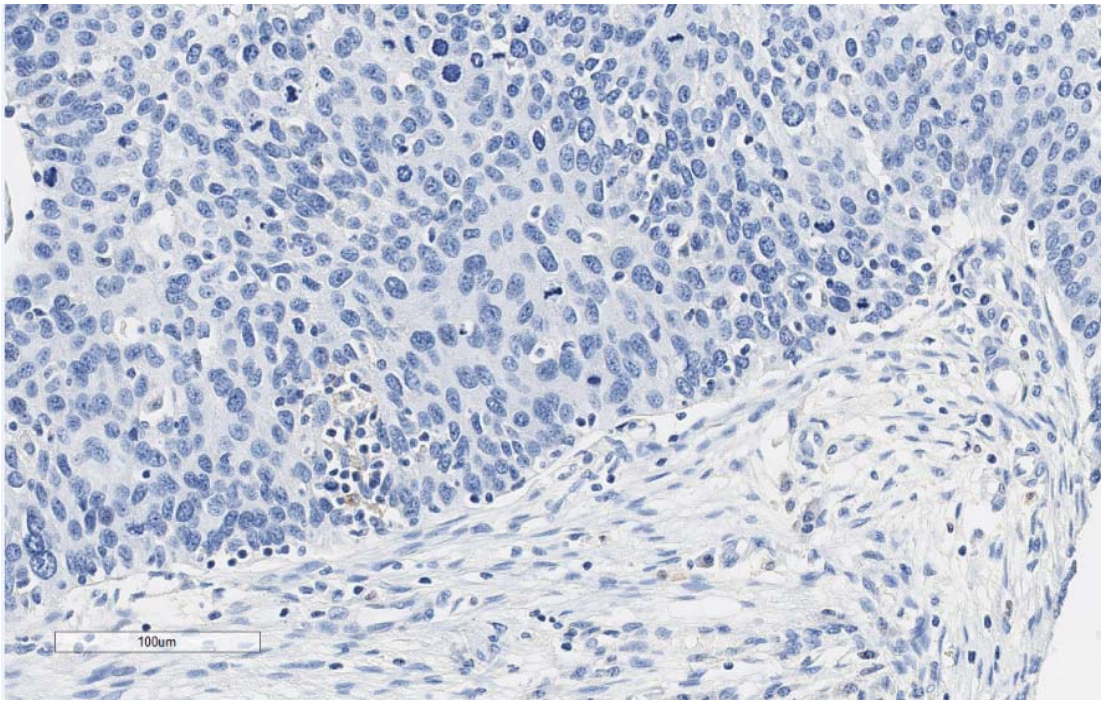
de Vries HM, Ottenhof SR, Horenblas S, van der Heijden MS, Jordanova ES. Defining the tumor microenvironment of penile cancer by means of the cancer immunogram. Eur Urol Focus. 2019;5(5):718-21.

Wang P, Zhang X, Sun N, Zhao Z, He J. Comprehensive analysis of the tumor microenvironment in cutaneous melanoma associated with immune infiltration. J Cancer. 2020;11(13):3858-70.

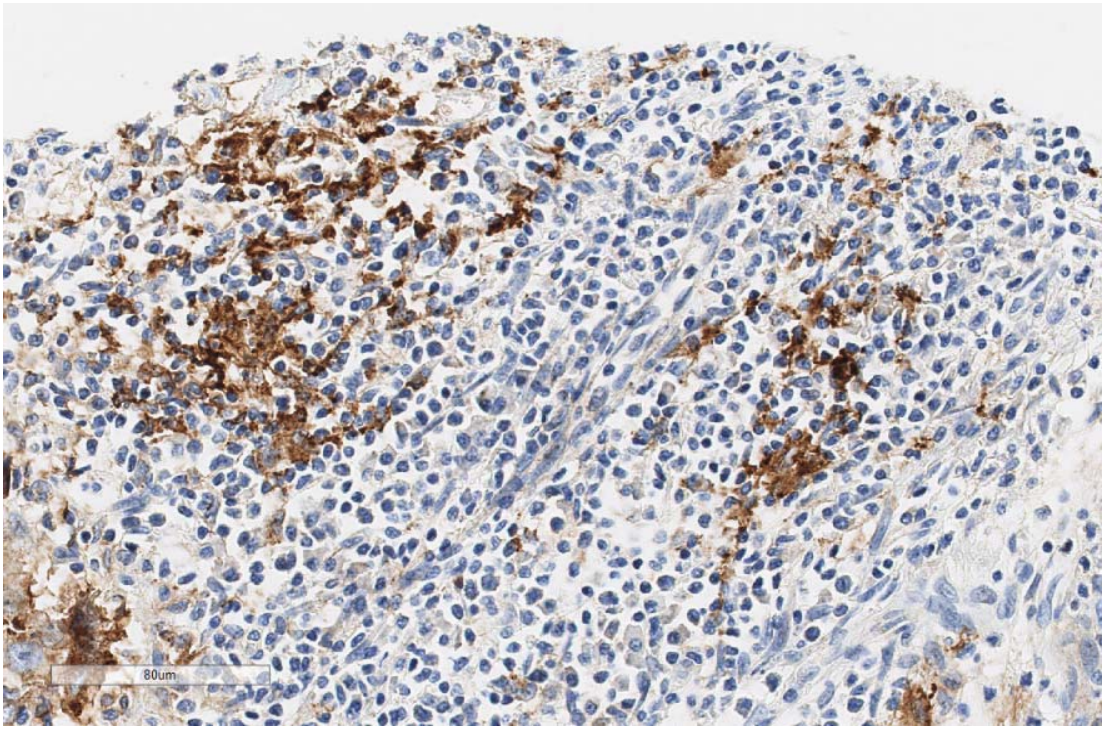
Xie F, Xu M, Lu J, Mao L, Wang S. The role of exosomal PD-L1 in tumor progression and immunotherapy. Mol Cancer. 2019;18(1):146.

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

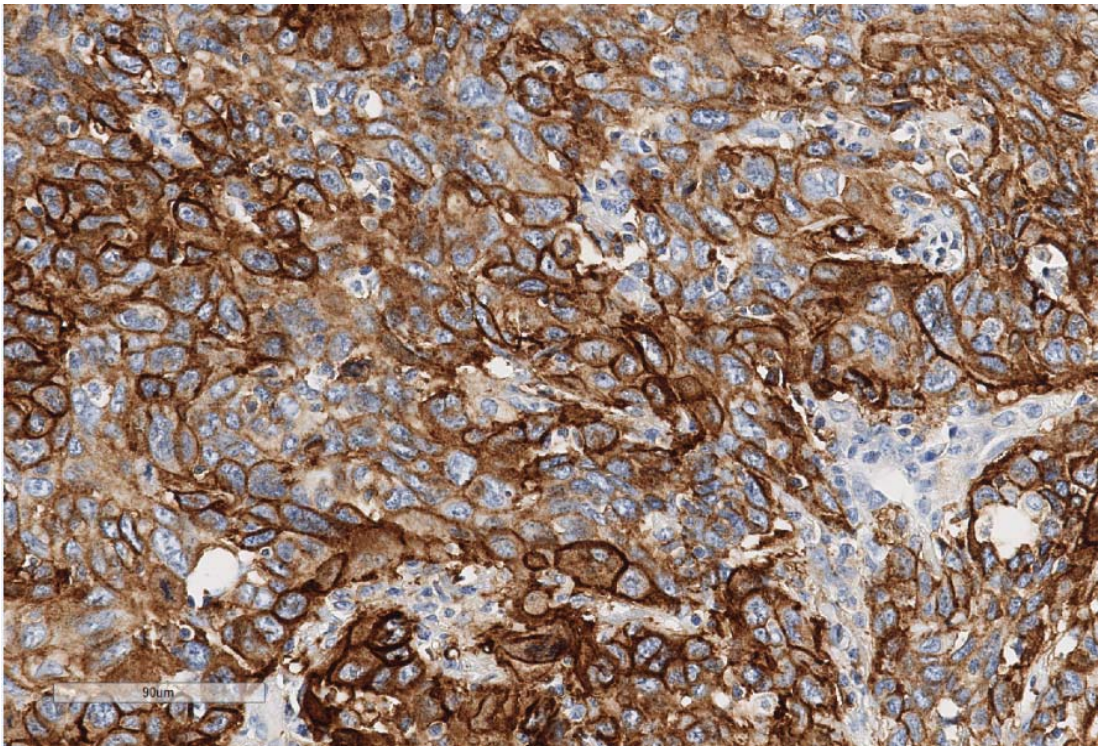
Apêndice 1 – Figuras 1 e 2. Dados brutos para análises estatísticas



(A): Ausência de imunoexpressão de PD-L1 em células tumorais (CT) e células inflamatórias (CI), ou seja, macrófagos e linfócitos.

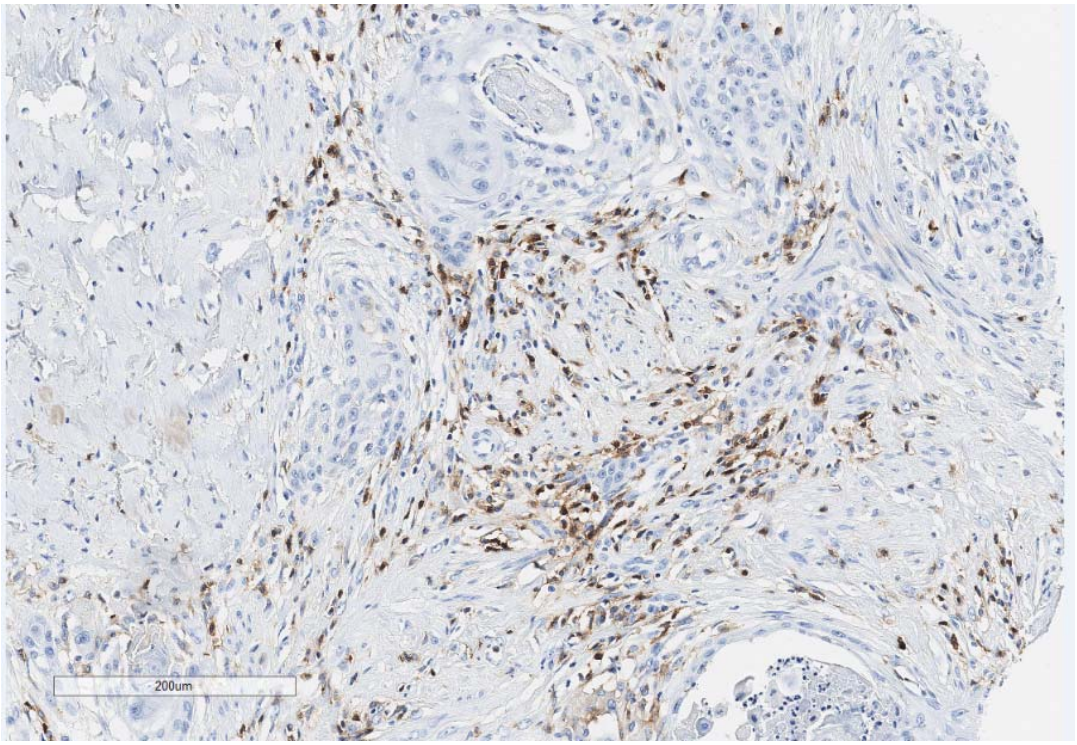


(B) Imunoexpressão de PD-L1 (clone 263) 2+ em CI.

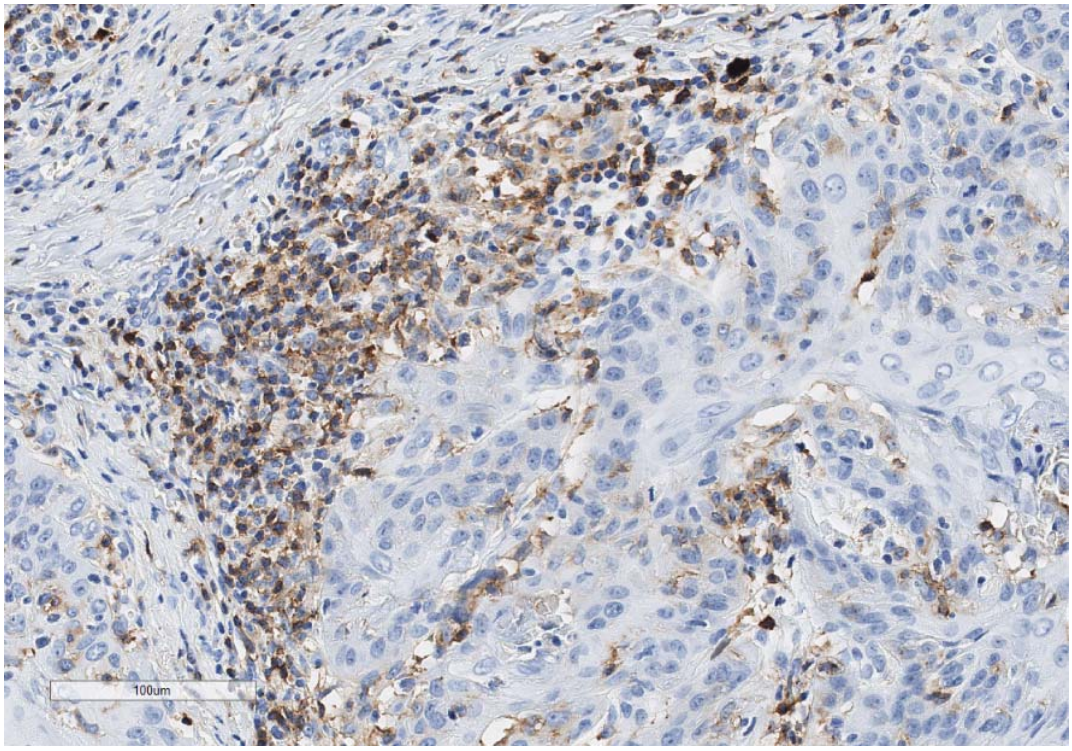


(C): Imunoexpressão de PD-L1 (clone 263) 3+ em CT.

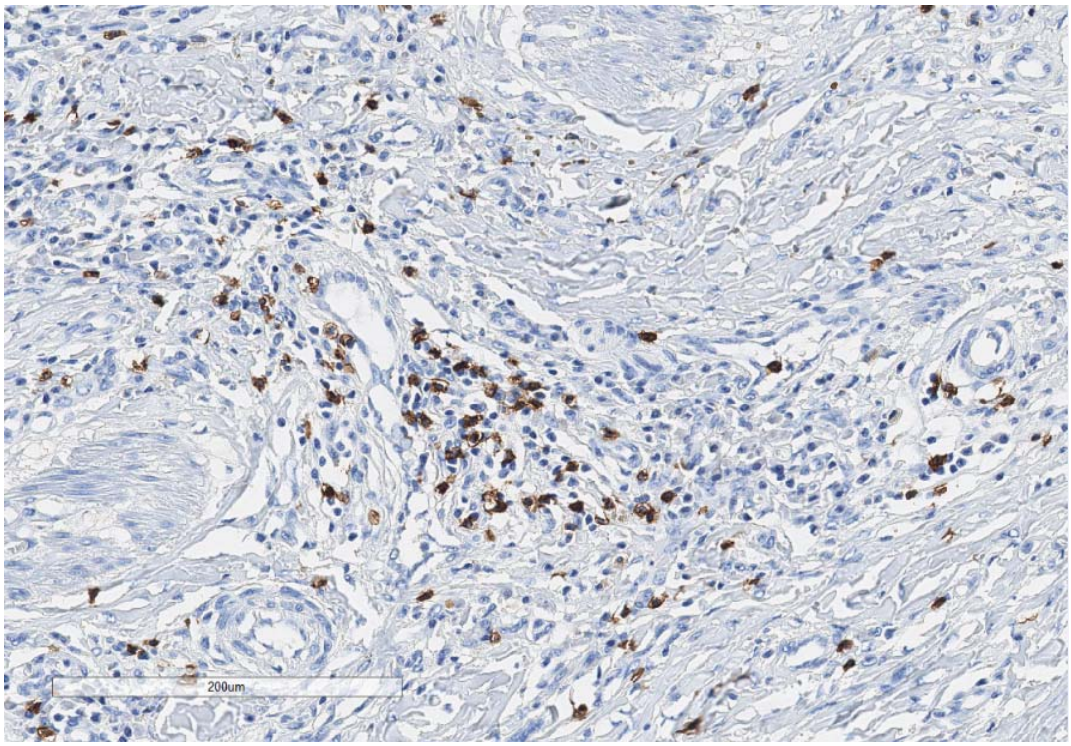
Figura 2 A, B, C, D, E e F



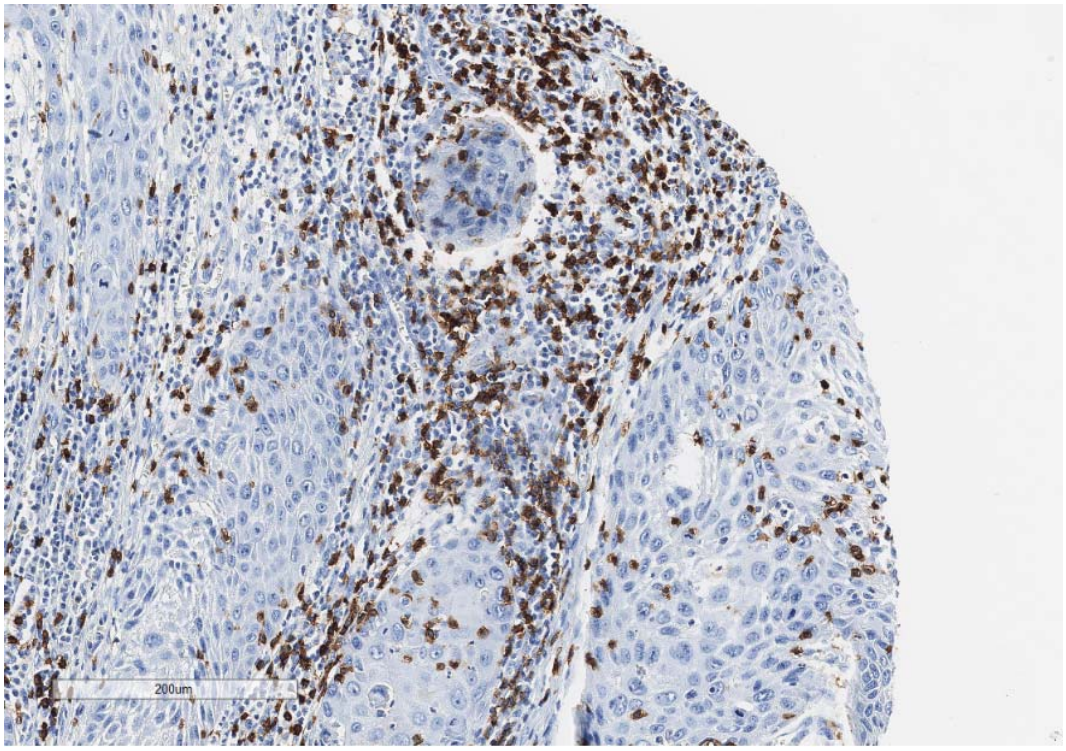
(A): Imunoexpressão de CD4 1+.



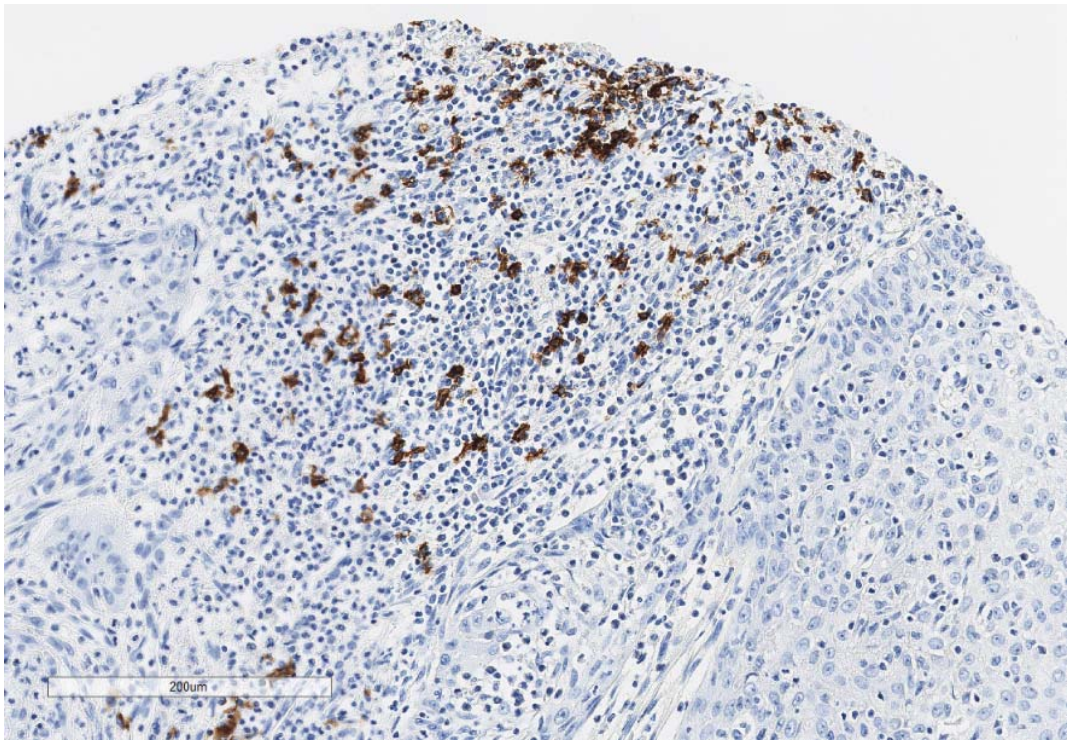
(B): Imunoexpressão de CD4 2+.



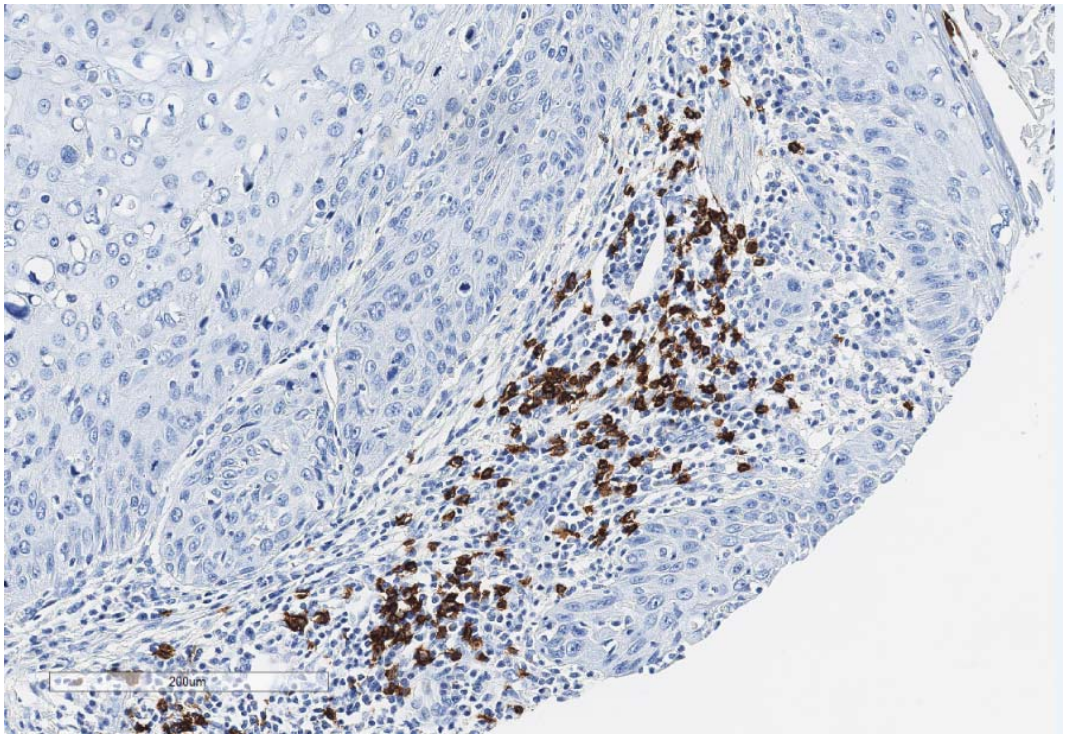
(C): Imunoexpressão de CD8 1+.



(D): Imunoexpressão de CD8 2+.



(E): Imunoexpressão de CD20 1+.



(F): Imunoexpressão de CD20 2+.