

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA
MICROVASCULARIZAÇÃO EM CARCINOMA
PENIANO E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO
PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO**

BRUNO VINICIUS VILELA DE AQUINO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. José Vassallo

Co-Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Aquino, Bruno Vinicius Vilela de

Estudo imunoistoquímico da microvascularização em carcinoma peniano e sua relação com a infecção pelo papilomavirus humano /

Bruno Vinicius Vilela de Aquino - São Paulo, 2013.

90p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. NEOPLASIAS PENIANAS. 2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 3. IMUNOISTOQUIMICA. 4. HPV. 5. CD105. 6. ANGIOGÊNESE.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o suporte nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao meu orientador Dr. José Vassallo por todos os ensinamentos e confiança.

Aos meus pais e a minha avó por todo o suporte nesse período.

Aos meus amigos pela paciência e suporte.

Ao meu co-orientador Dr. Rafael Malagoli Rocha pela oportunidade

À FAPESP e a CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do Banco de Macromoléculas, Laboratório de imunoistoquímica, Comitê de Ética, SAME e Arquivo de Anatomia Patológica pelo auxílio prestado.

RESUMO

Vilela BVA. **Estudo imunoistoquímico da microvascularização em carcinoma peniano e sua relação com a infecção pelo papilomavirus humano.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma de pênis (CaPe) incide predominantemente em regiões menos desenvolvidas do globo. Seus fatores de risco incluem má higiene genital, fimose e infecção por HPV (human papillomavirus). A ativação angiogênica é essencial à sobrevivência das células neoplásicas, porém não há dados desse processo em CaPe. **Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo correlacionar a infecção pelo HPV com o processo angiogênico em CaPe. **Métodos:** Foram incluídos 60 pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas de pênis, provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, diagnosticados entre 1954 e 2010, genotipados para HPV (33 negativos ou com HPV de baixo risco e 27 positivos para HPV de alto risco). Foi feita a análise imunoistoquímica da microvasculatura relacionada à neoplasia (marcadores endoteliais CD34, CD31, CD105 e D2-40) e de fatores pró-angiogênicos (VEGF, VEGFR1 e VEGFR2) nas células neoplásicas. **Resultados/Conclusão:** Apenas a neoangiogênese, marcada pelo CD105, esteve mais pronunciada em casos associados ao HPV de alto risco. Isto aponta para um mecanismo adjuvante da neoangiogênese promovida ou facilitada por esse vírus. Além disto, maior expressão de VEGF e VEGFR1 pelas células neoplásicas associou-se com a presença de infiltração linfonodal, fator de pior prognóstico da doença. Nossos dados não apóiam a utilização da imunorreatividade para a proteína p16 como substituto para a genotipagem para HPV de alto risco em CaPe.

SUMMARY

Vilela BVA. [Immunohistochemical study of microvasculature in penile carcinoma, and its relationship to infection with the human papillomavirus]. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Penile carcinoma (PeCa) incides predominantly in regions with unfavorable socioeconomic conditions. Inadequate genital hygienic habits, phimosis, and high risk-HPV (human papillomavirus) infection represent its most important risk factors. Angiogenic activation is fundamental for survival of neoplastic cells, but this process has not yet been addressed in PeCa.

Objective: To correlate HPV infection with the angiogenic process in cases of PeCa. **Methods:** Sixty patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the penis, from 1954 to 2010, at the A C Camargo Cancer Center; 27 were positive for high risk HPV and 33 negative (3 of which had low risk HPV). Immunohistochemical analysis of microvasculature using markers for CD31, CD34, CD105 and D2-40, and evaluation of proangiogenic factors (VEGF, VEGFR1 and VEGFR2) in neoplastic cells were performed. **Results/**

Conclusions: Only neoangiogenesis detected by more prominent immunostaining for CD105 was related to high risk HPV. This may indicate that neoangiogenesis might be promoted or facilitated by viral infection. In addition, stronger expression of VEGF and VEGFR1 in neoplastic cells was associated with lymph node neoplastic infiltration, known factor of unfavorable outcome. Our data do not support using immunoreactivity of p16 protein as indicator of genotyping for high risk HPV in PeCa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial do carcinoma de pênis.....	2
Figura 2	Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetida à análise IHQ para a avaliação dos marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2.....	47
Figura 3	Teste de Mann-Whitney para Estádio N (VEGF).....	49
Figura 4	Teste de Mann-Whitney para Estádio N (VEGFR1).....	49
Figura 5	Teste de Mann-Whitney para Invasão Perineural (VEGFR1)..	50
Figura 6	Teste de Mann-Whitney para Grau Histológico (VEGFR2).....	51
Figura 7	Teste de Mann-Whitney para Invasão Vascular (VEGFR2)....	51
Figura 8	Teste de Mann-Whitney para Invasão Perineural (VEGFR2)..	52
Figura 9	Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetida à análise IHQ para a avaliação do marcador p16..	53
Figura 10	Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetidos à análise IHQ para a avaliação dos marcadores CD34, CD31 e CD105.....	53
Figura 11	Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetido à análise IHQ para a avaliação do marcador D2-40.....	54

Figura 12	Teste de Mann-Whitney para Grau Histológico (CD34).....	57
Figura 13	Teste de Mann-Whitney para Invasão Corpo esponjoso (CD34).....	57
Figura 14	Teste de Mann-Whitney para HPV (CD105).....	58
Figura 15	Teste de Mann-Whitney para Invasão Vascular (área média) CD105.....	59
Figura 16	Teste de Mann-Whitney para Invasão Vascular (área mediana) CD105.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação dos tipos de papilomavirus humano (HPV).....	7
Quadro 2	Classificação histopatológica dos carcinomas penianos.....	11
Quadro 3	Estádio TNM dos carcinomas penianos.....	15
Quadro 4	Resumo das principais alterações moleculares encontradas na literatura em carcinomas penianos.....	16
Quadro 5	Fatores pró-angiogênicos e inibitórios da angiogênese.....	27
Quadro 6	Anticorpos utilizados para a reação de imunistoquímica.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados demográficos dos 60 pacientes portadores de carcinoma de pênis provenientes do A.C. Camargo Cancer Center e segundo status do HPV.....	40
Tabela 2	Dados clínicos dos 60 pacientes portadores de carcinoma de pênis, provenientes do A.C. Camargo Cancer Center e segundo status do HPV.....	41
Tabela 3	Relação entre <i>status</i> , recidiva, local e estádios (T e N) relacionados com HPV dos 60 pacientes com câncer de pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	43
Tabela 4	Dados anátomo-patológico, referente aos 60 pacientes portadores de carcinoma de pênis.....	45
Tabela 5	Distribuição dos tipos de HPV em 30 casos positivos.....	46
Tabela 6	Valores de mediana dos marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2.....	47
Tabela 7	Resultado da análise estatística do VEGF, VEGFR1 e VEGFR2.....	48
Tabela 8	Resultado do p16 em positivo e negativo.....	52
Tabela 9	Resultado estatístico dos anticorpos CD34, CD31, CD105 e D2-40 para endotélio linfático.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Tri-Fosfato
CaPe	Carcinoma de pênis
CD105	Endoglina CD105
CD31	Cluster of Differentiation 31
CD34	Cluster of Differentiation 34
CEC	Carcinoma espinocelular
COX2	Cicloxygenase 2
D2-40	Sialoglicoproteína linfática
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAU	European Association of Urology
EGF	Epidermal Growth Fator
ERK	Kinase Regulada por Sinal Extracelular
FGF	Fibroblast Growth Factor
H&E	Hematoxilina-Eosina
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HPV	Human papillomavirus
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIT	Linfócitos Infiltrando Tumores
LS	Lichen Sclerosus
MAPK	Proteína Kinase Ativada por Mitógeno
MD	Densidade Microvascular
MdVa	Área Vascular Mediana
MVA	Área Vascular Média
P53	Proteína p53
p16^{INK4a}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Fator
PeIN	Penile Intraepithelial Neoplasia

PIGF	Placental Growth Fator
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinase
PKC	Proteína Kinase C
PLCY	Fosfolipase Cy
Src	Receptores Esteroidais
TAF	Tumor Angiogenesis Fator
TK	Tirosina Kinase
TVA	Área Microvascular Total
VEGF	Vascular Endothelial Growth Fator
VEGFR1	Vascular Endothelial Growth Fator Receptor 1
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Fator Receptor 2

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de pênis e sua estatística.....	1
1.2	Fatores de risco.....	4
1.2.1	Fatores higiênicos e fimose.....	4
1.2.2	Tabagismo.....	5
1.2.3	Associação viral.....	6
1.2.4	Sexo com animais.....	8
1.2.5	Lesões epiteliais precursoras.....	8
1.3	Classificação Histológica.....	9
1.4	Fatores de prognóstico.....	12
1.5	Alterações moleculares.....	15
1.6	Microambiente tumoral.....	18
1.7	Angiogênese.....	19
1.8	Marcadores angiogênicos.....	22
1.8.1	O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).....	22
1.8.2	VEGFR1 e VEGFR2.....	23
1.8.3	CD34.....	24
1.8.4	CD31.....	24
1.8.5	CD105.....	24
1.8.6	D2-40.....	25
1.8.7	p16INK4a.....	25
1.9	Angiogênese no processo tumoral.....	26
2	OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	31
2.1	Objetivos secundários.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Genotipagem do HPV.....	32
3.2	Reação Imunoistoquímica.....	34

3.3	Avaliação morfométrica dos preparados imunoistoquímicos.....	36
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos	39
5.1.1	Dados demográficos.....	39
5.1.2	Dados clínicos	40
5.1.3	Dados anatomopatológicos	43
5.2	Avaliação imunoistoquímica	46
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do
A.C.Camargo Cancer Center

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PÊNIS E SUA ESTATÍSTICA

O carcinoma de pênis (CaPe) representa um importante problema da saúde, especialmente em regiões menos desenvolvidas do globo. Sua incidência varia entre os países, indo de alta (2-4/100.000 hab) na África, Ásia e América do Sul (especialmente Brasil e Paraguai) a baixa (0,3-1/100.000 hab) na China, América do Norte, Europa central, Japão e alguns países da América do Sul, como Chile. Apresenta incidência considerada intermediária (1-2/100.000 hab) em países como Portugal, Itália, Índia, Tailândia, Austrália, Colômbia, Peru e Argentina (CHAUX e CUBILLA 2012).

Portanto, não é regra que todos os países de um mesmo continente com situação socioeconômica similar sejam atingidos da mesma forma por esta doença. Como pode ser observado na figura 1, na América do Sul há variação de baixa incidência (Chile, com 0,7/100.000 hab), até muito alta (Paraguai, com 4,2/100.000 hab). Na África, o Zimbábue apresenta incidência baixa (0,9/100.000 hab) em contraste com Uganda (2,8/100.000 hab). Essa discrepância pode ser explicada, pois, o carcinoma de pênis não é uma doença muito estudada e nem todos os casos não serem devidamente notificados, o que resulta na baixa produção científica sobre o assunto. Outro argumento para essa diferença é explicada pelo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH/2013) dos países, como exemplo o Chile

tem índice considerado “muito elevado” (0,819), enquanto o Brasil apresenta-se com o índice considerado “elevado” (0,730). A classificação do Brasil com um índice alto de CaPe dá-se pela diferença de casos dentro do país, variando de 5,7% no Nordeste, 5,3% no Norte, 3,8% no Centro-Oeste, 1,4% no Sudeste e 1,2% no Sul. Os fatores culturais como circuncisão (a exemplo os judeus como fator positivo contra o CaPe), o uso de tabaco, população rural com baixa instrução, educação sexual etc, contribuem para esse achado (CHAUX e CUBILLA 2012).

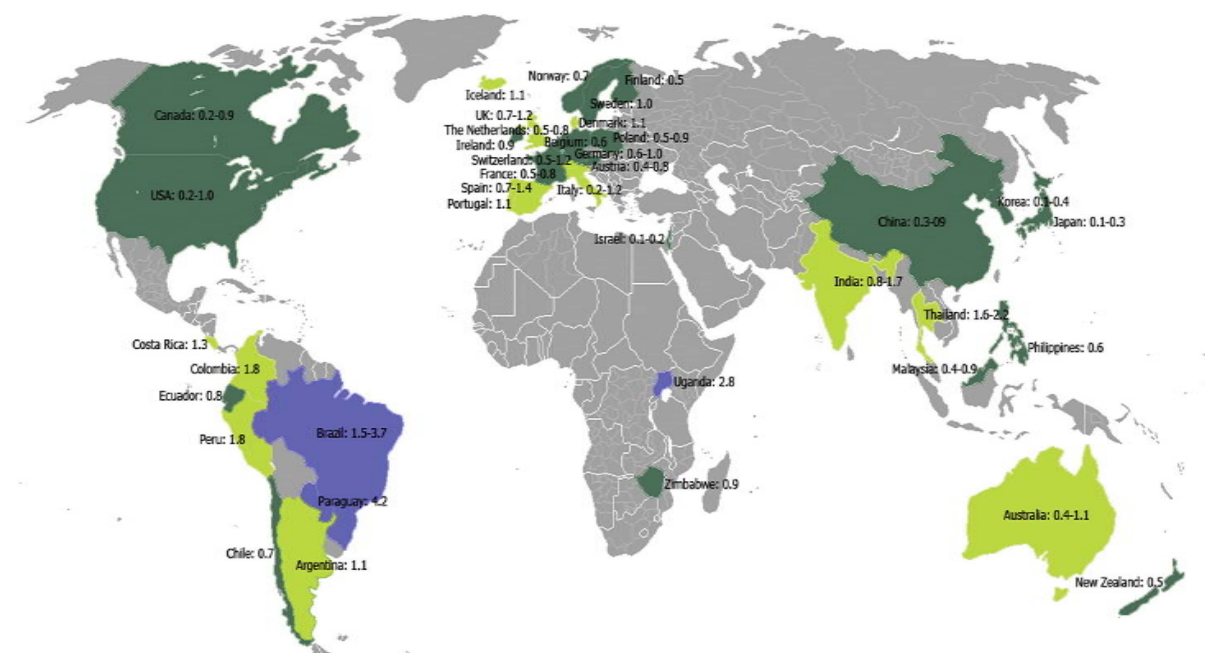


Figura 1 - Distribuição mundial do carcinoma de pênis

Da mesma forma, num mesmo país, sua incidência pode variar, como no caso do Brasil. Em estudo de 283 casos diagnosticados entre maio de 2006 e agosto de 2007, FAVORITO et al. (2008) reportaram que 53% foram diagnosticados nas regiões norte e nordeste e 0,71% na sudeste. Houve

incidência significativamente maior nas regiões economicamente menos favorecidas do país.

Além da variação regional, a incidência pode variar no tempo. Em um estudo norte-americano, a incidência decresceu ao longo das décadas: 0,84/100.000 em 1973-1982, 0,69/100.000 em 1982-1992, 0,58/100.000 em 1993–2002. O diagnóstico de doença localizada aumentou relativamente no decorrer dessas décadas. Entre os diversos grupos étnicos, de 1993 a 2002, os hispânicos brancos tiveram a maior incidência (1,01/100.000 hab), seguidos pelos índios americanos e nativos do Alasca (0,77/100.000 hab) e pelos afroamericanos (0,62/100.000 hab) (BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007).

Este tipo de tumor acomete homens entre a quinta e a sétima década de vida, porém pacientes com idade inferior a 35 anos não são incomuns no Brasil. Chegando a 7% dos casos no estudo de FAVORITO et al. (2008). O CaPe é uma doença locorregional, e a sua sobrevida em 5 anos cai dramaticamente em pacientes com metástases linfonodais. Este tumor pode acarretar grande morbidade, tanto pela doença em si, quanto pelo tratamento, que pode incluir a amputação parcial ou total do órgão. Embora seja uma doença de diagnóstico relativamente fácil, os pacientes continuam procurando atendimento médico em estádios avançados, com linfonodos comprometidos e, portanto, com prognóstico desfavorável. A taxa de mortalidade relacionada a esta neoplasia varia de 26,7 a 41% (FAVORITO et al. 2008).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi estimado para 2012 um total de 195.190 casos de câncer em homens brasileiros,

excluindo-se o carcinoma de “pele não-melanoma”. Desse total 2% corresponderiam ao câncer de pênis, ou seja, aproximadamente 3.900 casos. Em 2010 foram registradas 363 mortes decorrentes do CaPe, contra 182.830 casos de câncer geral. Este tipo de neoplasia não se enquadra no grupo dos grandes problemas de saúde pública do Brasil, embora seja importante, pois registra-se números baixos quando comparados às neoplasias de alta incidência, como a de próstata e pulmão. Porém, quando diagnosticada, é de extrema importância, por afetar intensamente a área psico-social do paciente. Torna-se assim, um tema relevante a ser estudado (Ministério da Saúde 2011).

1.2 FATORES DE RISCO

Os fatores de risco para o CaPe incluem má higiene genital e fimose, infecção viral, radiação ultravioleta, fumo, prática sexual não-segura, entre outros.

1.2.1 Fatores higiênicos e fimose

O esmegma é formado pela combinação de células epiteliais esfoliadas com óleos, gorduras e produtos da bactéria *Mycobacterium smegmatis*, podendo acumular-se sobre o prepúcio. A produção do esmegma é maior em pessoas mais jovens, com pico entre 20 e 40 anos de idade. Inicialmente, é um lubrificante amarelado ou branco, durante muito tempo, acreditou-se que poderia causar câncer. Alguns estudos entre 1940 e

1960 tentaram comprovar tal evidência, sendo poucos ainda considerados válidos por vários pesquisadores. Outros autores, no entanto, argumentam que estes estudos basearam-se em modelos animais, em que o esmegma humano foi introduzido na pele ou vagina de ratos. Estes autores acreditam que a evidência de associação do esmegma com o desenvolvimento do câncer é fraca e pode ser explicado pela inflamação crônica devido a um antígeno exógeno na mucosa (GUIMARÃES et al. 2011).

Um fator considerado positivo para a prevenção do CaPe é a circuncisão, efetuada sistematicamente por motivos religiosos entre alguns povos, como os judeus. Crianças que passaram por esse procedimento ao nascimento têm incidência nula; se a circuncisão ocorrer entre 3 e 12 anos, aumenta-se a frequência de CaPe para 0,15%, diferentemente dos 3,1% apontados para homens que não efetuaram este procedimento. Como a circuncisão está diretamente associada a maior facilidade de expor totalmente a glândula e permitir melhor higienização, estes fatores mostram forte associação epidemiológica com a proteção para o CaPe (GUIMARÃES et al. 2011).

1.2.2 Tabagismo

Apesar de uma associação com o fumo ter sido observada repetidamente, o papel exato que este fator desempenha no desenvolvimento desta doença permanece desconhecida. Existe uma associação entre homens que fumavam quando foram diagnosticados com CaPe, tanto *in situ* quanto invasivo, em uma revisão feita por GUIMARÃES

et al. (2011). Foi encontrada uma relação dose-resposta, entre os fumantes que consumiam 10 ou mais cigarros ao dia, com risco significativamente maior do que os fumantes leves. O risco de CaPe entre os homens que fumavam no momento do diagnóstico foi de 2,8 vezes maior do que os homens que nunca fumaram. Levantaram a hipótese de que a associação entre o fumo e o CaPe possa estar ligada aos elementos metabólicos que essa substância produz no organismo.

1.2.3 Associação viral

A patogênese do CaPe tem sido descrita como produzida por duas vias importantes: uma com e outra sem relação com o papilomavirus humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*). A relação desse vírus com o CaPe tem sido relatada com variação entre 10-80%. Essa disparidade pode ser explicada pela diversidade de sensibilidade dos testes de detecção como a imunistoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), hibridação *in situ* ou Southern blot, bem como pela diferença dos tipos de preservação da amostra (congelada, fresca ou parafina). No Brasil, indivíduos positivos para o HPV tem maior probabilidade desenvolver esta neoplasia, 30% de chance. Um estudo publicado por Schneider *et al.* mostrou uma incidência de 75% de HPV em pacientes com tumor invasivo (GUIMARÃES et al. 2006).

O Quadro 1 mostra os principais tipos de HPV envolvidos na patogênese dos cânceres em geral, incluindo o de pênis.

Quadro 1 - Classificação dos tipos de papilomavirus humano (HPV), segundo o risco de associação com carcinomas

Classificação	Tipos HPV
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Intermediário	26, 53, 66, 68, 73, 82
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Fonte: ZUR HAUSEN (2002).

Os tipos mais comuns de HPV relacionados ao CaPe são o HPV16 e HPV18. O HPV16 é mais prevalente na América do Norte, Europa, América do Sul e Índia. Embora o HPV18 seja o segundo tipo mais usualmente identificado nas amostras de carcinoma espinocelular (CEC), tem uma prevalência baixa entre todos os tipos histológicos. Ainda é discutido se a infecção pelo HPV pode influenciar o prognóstico em pacientes com CaPe (CHAUX e CUBILLA 2012).

Outro fator que deve ser considerado é a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*). O mecanismo pelo qual a imunossupressão relacionada a esse vírus desempenha um papel no aumento do risco de CaPe associado ao HPV ainda não está totalmente ilustrada. Entre os indivíduos infectados com o HIV, a incidência de CaPe invasivos associados ao HPV não parece ter uma relação com a contagem das células TCD4+, que serve para medir o padrão de resposta imune. A sobrevivência prolongada de indivíduos infectados com HIV, juntamente com um sistema imunológico comprometido poderia levar a um aumento da incidência de câncer (GUIMARÃES et al. 2011).

1.2.4 Sexo com animais

Outro fator de risco recentemente considerado importante é o sexo com animais. Foi demonstrado em estudo de 492 pacientes, 118 com CaPe e 374 controles, homens com histórico de sexo com animais esteve presente em 44,9% do primeiro grupo e 31,6% do grupo controle. Não se sabe como este hábito aumenta o risco de CaPe, podendo-se incluir como possibilidades a transmissão de agentes infecciosos oncogênicos ainda não determinados, má higiene associada a essa prática, ou apenas interdependência que esta prática tem com outros fatores de risco estabelecido para essa neoplasia (ZEQUI et al. 2012).

1.2.5 Lesões epiteliais precursoras

O líquen escleroso (LS, *lichen sclerosus*) constitui uma doença inflamatória crônica que pode levar à fimose e à estenose do meato uretral. As lesões são inicialmente poligonais, placas achatadas de cor branca, que evoluem para placas atróficas e esclerosadas. Os sítios anatômicos mais comumente afetados são a glândula e o prepúcio, mas outras regiões (como o freio, meato uretral e da uretra anterior) também podem estar envolvidos. Menos comumente, o LS pode envolver o corpo do pênis. Estas lesões manifestam-se entre 36 e 83 anos de idade, com uma média de 54 anos, sendo mais comum em homens não circuncidados. A etiopatogenia do LS permanece desconhecida, mas algumas das causas possíveis são: autoimunidade, infecção (*Borrelia burgdorferi*, HPV, vírus da hepatite C), fatores hormonais, traumas (queimadas, radioterapia, cirurgia) e estenose meatal. A

associação do LS com CaPe ainda permanece controversa (CARLSON et al 2013). CALMON et al. (2011) mostraram que dos 121 casos de neoplasia intraepitelial peniana (PeIN, do inglês *penile intraepithelial neoplasia*), 51% dos casos de PeIN bem diferenciada estavam associadas com LS e com carcinoma epidermóide queratinizado. Por outro lado, não houve associação de LS com os tipos de PeIN pouco diferenciado, carcinoma basalóide ou “warty”. A eritroplasia de Queyrat e a doença de Bowen eram erroneamente citadas como lesões pré-malignas. Na verdade ambas as lesões são malignas, porém não invasivas.

1.3 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

O tipo histológico mais frequente de CaPe, representando 95% dos tumores malignos de pênis, é o carcinoma de células escamosas ou espinocelular (CEC). Do ponto de vista de crescimento, pode ser dividido em dois grupos: forma exofítica (papilar) e endofítica (infiltrativo, ulceroso). A forma exofítica é bem diferenciada e fortemente queratinizada, podendo se transformar em uma grande massa polipóide. O CEC exofítico é geralmente localizado na glândula e pode ocorrer no prepúcio, já a forma endofítica é mais indiferenciada, ocorrendo no prepúcio, glândula e mais raramente na haste. Tumores ulcerados têm maiores taxas de metástase ganglionar. O carcinoma verrucoso é uma variante do CEC, de comportamento clínico menos agressivo. De modo inverso à tendência infiltrativa e ulcerada do CEC, o carcinoma verrucoso constitui uma lesão vegetante, de crescimento lento e

com menor potencial de metastatização. Outras neoplasias mais raras incluem o carcinoma basocelular, sarcoma de Kaposi, melanoma e linfoma (PAULA et al. 2005).

A graduação histológica mais comumente usada para o CEC é a de Broders. Este sistema baseia-se fundamentalmente no grau de queratinização, número de mitoses e no pleomorfismo nuclear. Quatro graus são identificáveis, sendo como exemplo o grau I, referente às lesões bem diferenciadas e o grau IV aos tumores indiferenciados. Geralmente a graduação histológica correlaciona-se com a profundidade do tumor, bem como com o risco de metástase inguinal. Vários autores encontraram associação entre lesões de alto grau, maior risco de comprometimento de linfonodos inguinais e maior risco de óbito pela doença. Dentro do grupo de células escamosas, existe uma divisão em subtipos, conforme o Quadro 2 (GUIMARÃES et al. 2009).

Quadro 2 - Classificação histopatológica dos carcinomas penianos

Subtipo	Frequência	Principais características	Taxa de metástase	Prognóstico
Usual	48-65%	Mais comum, similar a outros carcinomas epidermóides em outros tecidos	28-39%	Intermediário
Basalóide	4-10%	Tumor agressivo associado ao HPV, composto de ninhos de tumores profundamente invasivos de células basalóides	50-100%	Desfavorável
Verrucoso	3-8%	Tumor de baixo grau, geralmente invadindo apenas a superfície	Nulo	Excelente
Warty	7-10%	Similar ao verrucoso	17-18%	Bom
Papilar	5-15%	Baixo grau, geralmente invade tecidos eréteis	12%	Bom
Sarcomatóide	1-3%	Profundamente invasivo e agressivo, semelhante ao fibrossarcoma, com necrose freqüente	75-89%	Desfavorável
Cuniculatum	<1%	Profundamente infiltrativo	Nulo	Excelente
Pseudo-hiperplásico	<1%	Tumor de baixo grau, afeta mucosa do prepúcio	Nulo	Excelente
Adenoescamoso	1-2%	Tumor invasivo composto de áreas de diferenciação entre escamoso e glandular	50%	Bom
Pseudoglandular	<1%	Tumor invasivo composto por ninhos neoplásicos sólidos	43%	Desfavorável

1.4 FATORES DE PROGNÓSTICO

A manifestação clínica mais comum do CaPe é uma ferida ou úlcera persistente, ou também uma tumoração localizada na glândula, prepúcio ou corpo do pênis. A presença de um desses sinais, associados a uma secreção (esmegma), pode ser uma indicação da neoplasia. Além da tumoração no pênis, a presença de gânglios inguinais palpáveis pode ser sinal de progressão da doença.

O CaPe apresenta um padrão de crescimento local e um padrão previsível de disseminação; local, regional e distante. É essencialmente uma doença loco-regional e a incidência de metástases distantes varia de 1% a 10% (CUBILLA et al. 2004). Há alguns fatores patológicos que influenciam o prognóstico, mas a validação da maioria deles torna-se difícil por causa da grande variedade de protocolos clínicos, variação geográfica em estudos populacionais, e da metodologia aplicada. Vários destes marcadores clínicos e histopatológicos têm sido descritos como úteis na determinação do prognóstico, incluindo nomogramas que tentam prever a presença de metástase linfonodal (SOLSONA et al. 2001).

A presença de metástases em linfonodos é o fator de prognóstico mais importante nos pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis. Esse tipo de metástase é importante, não só para prognóstico, mas também para a avaliação de morbidade. Metástases em linfonodos inguinais geralmente estão relacionadas com o estágio do tumor, profundidade da invasão, tipo e grau histológico. A sobrevida em cinco anos

diminui drasticamente, sendo inferior a 40% em pacientes com metástases ganglionares. A presença de micrometástase não foi comprovada como fator prognóstico e foi demonstrada casos com depósitos micrometástáticos em análises de 217 linfonodos negativos de 11 pacientes com CaPe. Neste caso isolado não houve recorrência (LOPES et al. 1996a).

A importância do grau histológico para o prognóstico do CaPe está bem documentada na literatura. Há uma relação consistente entre o grau histológico de diferenciação, metástase linfonodal e sobrevivência. Recentemente, VELAZQUEZ et al. (2005) demonstraram que o grau histológico é mais importante do que o nível da infiltração. A determinação do grau do tumor requer uma análise detalhada, devido à presença de vários graus no mesmo tumor. A classificação de Broder é comumente usada por alguns autores, a fim de classificar os tumores nas classes 1-4. No entanto, o sistema de classificação mais comum é o de três graus: bem, moderadamente e pouco diferenciado. Tumores bem diferenciados não apresentam células anaplásicas; tumores moderadamente diferenciados apresentam menos de 50% de células anaplásicas e casos pouco diferenciados apresentam mais de 50% das células anaplásicas. Embora este sistema seja amplamente utilizado para a avaliação, existe falta de consenso em vários métodos de classificação.

A invasão linfovascular por células tumorais foi considerado fator de risco para metástase linfonodal. Geralmente ocorre no *front* de invasão, mas também pode ser vista na fascia, lâmina e tecido conjuntivo subepitelial do pênis, geralmente indicando estágio mais avançado da doença (NOVARA

et al. 2007). Há pouca informação sobre o papel da invasão perineural como fator prognóstico em carcinoma de pênis e sua presença varia de 26% a 51% dos casos. Recentemente, CUBILLA et al. (2011), estudando uma casuística de 375 pacientes, observaram que em 99 (26%) casos, a invasão perineural foi caracterizada. A Invasão perineural deve ser distinguida de envolvimento do nervo e, geralmente, ocorre perto do *front* da invasão do corpo esponjoso e dartos prepucial. É considerado um importante fator prognóstico para a sobrevida global e se correlaciona com metástases em linfonodos (CUBILLA et al. 2007).

Atualmente utiliza-se a classificação TNM, para estadiar os casos de CaPe (Quadro 3).

Quadro 3 - Estádio TNM dos carcinomas penianos

<p>T – Tumor primário</p> <p>TX - O tumor primário não pode ser avaliado</p> <p>T0 - Não há evidência de tumor primário</p> <p>Tis - carcinoma in situ</p> <p>Ta - carcinoma verrucoso não-invasivo, não associados à invasão destrutiva</p> <p>T1 - Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial</p> <p>T1a - Tumor que invade o tecido conjuntivo sub-epitelial sem invasão linfática e é pouco diferenciado ou indiferenciado (T1G1-2)</p> <p>T1b - Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial, sem/com invasão linfovascular ou é pouco diferenciado ou indiferenciado (T1G3-4)</p> <p>T2 - Tumor invade corpo esponjoso/cavernoso</p> <p>T3 - Tumor invade uretra</p> <p>T4 - Tumor invade outras estruturas adjacentes</p>
<p>N - Os linfonodos regionais</p> <p>NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados</p> <p>N0 - Ausência de linfonodo inguinal palpável ou visivelmente aumentado</p> <p>N1 - linfonodo palpável móvel unilateral inguinal</p> <p>N2 - palpáveis móveis bilateral ou vários linfonodos inguinais</p> <p>N3 - massa fixa inguinal nodal ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral</p>
<p>M – Metástases distantes</p> <p>M0 - Sem metástases distantes</p> <p>M1 - Metástases distantes</p>

Fonte: PIZZOCARO et al. (2009)

1.5 ALTERAÇÕES MOLECULARES

A relativa raridade do CaPe, principalmente em países desenvolvidos, juntamente com as dificuldades técnicas (interferência da presença de inflamação, necrose, e resultados desanimadores no desenvolvimento de cultura de células) faz com que haja poucos estudos sobre alterações moleculares de carcinoma peniano (Quadro 4).

Quadro 4 - Resumo das principais alterações moleculares encontradas na literatura em carcinomas penianos

Alteração molecular	Gene/Cromossomo
Copy number gain	8q24, 16p11-12, 20q11-13, 22q, 19q13, e 5p15
Deleção	13q21-22, 4q21-32 e ao longo do cromossomo X
Aneuploidia	Aneuploidia em carcinoma invasivo de pênis (CEC)
Superexpressão de gene em HPV+	p53
Superexpressão de genes	p53, p21, RB, e NF-κB
Baixa expressão de genes	p16 ^{INK4a}
Mutação de genes	p53, c-ras ^{Ha} PIK3CA, HRAS e KRAS
Desbalanço expressão proteica	Bcl-2/Bax
Hipermetilação do DNA na região promotora de gene	DAPK, FHIT, MGMT, p16 ^{INK4a} , p14 ^{ARF} , RAR-β, RASSF1A, RUNX3, e TSP-1

Há alterações no número de cópias de DNA em amostras de CaPe, com similaridades entre outros tipos de CECs, tais como o carcinoma oral e esofágico. Há ganho no número de cópias de DNA, incluindo 8q24, 16p11-12, 20q11-13, 22q, 19q13 e 5p15, e deleções no 13q21-22, 4q21-32, e ao longo do cromossomo X. ORNELLAS et al. (2008) descobriram uma população diplóide em carcinomas verrucosos. Também observaram que aneuploidia varia de acordo com o tipo de CaPe.

Vários estudos investigaram a relação entre a expressão de p53 e a infecção por HPV, assim como a relação entre a expressão do p53 com o prognóstico do carcinoma peniano. O oncogene E6 do HPV é conhecido por interferir na via do p53. A expressão de E7 foi relacionada à indução da proliferação persistente no domínio suprabasal, não houve nenhum efeito sobre a diferenciação terminal. As células que expressam apenas E7 foram

positivas para p53, enquanto as células E6 e E7 foram negativas, mas continuam a proliferar no compartimento suprabasal (ZUR HAUSEN 2002).

FERREUX et al. (2003) mostraram que a via p16^{INK4a}/ciclina D/retinoblastoma é de extrema importância para os CaPe, podendo ser interrompida por três mecanismos dependentes e independentes de HPV. Estes mecanismos incluem o bloqueio da função do gene do retinoblastoma pela oncoproteína E7, com regulação de p16^{INK4a} e silenciamento do gene p16^{INK4a} por metilação. Os autores postularam que a p16^{INK4a} pode atuar como um marcador de prognóstico potencial e que estes resultados têm importantes implicações sobre a potencial eficácia de vacinas contra o HPV para este tumor.

Estudos demonstraram o padrão de integração genômico do DNA do HPV em um pequeno número de pacientes com carcinoma de pênis. Estes estudos sublinharam o fato de que a integração dos tipos de HPV 16 e 18 foram localizados em sítios que contenham *c-myc* (8q24.1) e *n-myc* (2p24) proto-oncogenes. Outro estudo analisou possíveis mutações em *PIK3CA*, *PTEN*, *BRAF*, *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, e observou que as mutações *PIK3CA* foram encontradas em todos os graus e estágios, enquanto *HRAS* e *KRAS* estavam presentes em tumores maiores e mais avançados (FERREUX et al. 2003).

1.6 MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral representa um importante fator de controle para o processo oncogênico, ao crescimento tumoral e à metastatização. Neste segmento, podemos abordar a resposta imune ao tumor e o papel da angiogênese nos tumores (LOPES et al. 1996a).

Em relação ao processo imune associado ao tumor, trabalhos dos autores LOPES et al. (1996b) e ONO et al. (2002) mostraram que pacientes com carcinoma de pênis, onde há presença de eosinofilia foi associada à melhor sobrevida. Já CAMPOS et al. (1998) observaram que a atividade das células *Natural Killer* no sangue periférico foi estatisticamente diminuída em relação ao grupo controle, demonstrou também que o elevado número de linfócitos infiltrando tumores (LIT) são associados com melhor prognóstico. Todavia, um estudo em carcinoma de laringe demonstrou que LIT CD4+ mas não CD8+ são significativamente correlacionados com a sobrevida desses pacientes (BADOUAL et al. 2006). Já em carcinoma de ovário a presença de linfócitos T regulatórios (FoxP3+) predizem mal prognóstico. A presença de macrófagos associados a tumores em mama, próstata e bexiga apresentam pior prognóstico. O papel do infiltrado inflamatório peritumoral tem sido investigado em vários modelos tumorais, porém, pouco ou quase nada se sabe a respeito no carcinoma de pênis (CURIEL et al. 2004).

1.7 ANGIOGÊNESE

A angiogênese é um processo fundamental e complexo em que ocorre formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sendo essencial em condições fisiológicas como ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, embriogênese, crescimento tecidual, desenvolvimento mamário na lactação, resposta imune, inflamação e cicatrização. No adulto saudável, o *turnover* vascular é extremamente baixo e a angiogênese raramente ocorre. A angiogênese é essencial à sobrevivência de tumores (VALIATTI et al. 2011).

Apesar das anormalidades genéticas que promovem o crescimento tumoral, a sobrevivência das células neoplásicas agrupadas em formações sólidas não seria possível a partir do tamanho de 1mm^3 sem a ativação angiogênica. Essa exígua medida representa a distância máxima em que o oxigênio e os nutrientes podem ser oferecidos por simples difusão dos tecidos, dispensando a irrigação de vasos sanguíneos próprios. Além desse tamanho, na ausência da vascularização neoformada, o tumor deixa de aumentar e ocorre morte celular induzida por hipóxia e pela formação do óxido nítrico. Essa transição é conhecida como “ativação angiogênica”. Quando o tumor ultrapassa essa fase, novos vasos são formados continuamente. A hipóxia em áreas necróticas do tumor é um estímulo permanente para o crescimento da vascularização (FLORENCE et al. 2011).

A maior parte dos carcinomas inicia seu desenvolvimento a partir de pequenos nódulos avasculares equilibrados entre a proliferação e apoptose

até iniciarem a ativação angiogênica. O déficit na tensão tecidual de oxigênio e a consequente liberação de óxido nítrico suscitam a ativação de genes para a transcrição do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) (FLORENCE et al. 2011).

DVORAK (2005) sugeriu que o VEGF é o fator responsável pela formação de fenestrações entre as células endoteliais. Demonstraram que a partir da administração tópica de VEGF ocorre o surgimento de fenestrações no endotélio de pequenas vênulas e capilares, mesmo em regiões nas quais normalmente o endotélio não apresenta tais fenestrações. A produção de VEGF e demais fatores pró-angiogênicos pelas células tumorais influenciam a vascularização normal do hospedeiro e é essencial à sobrevivência do tumor. Inicia-se a partir da vasodilatação induzida pelo óxido nítrico em situações de baixa tensão de oxigênio. Frente à queda da tensão tecidual do oxigênio, o mRNA-VEGF é ativado para a transcrição de mediadores VEGF e HIF's (do inglês *hipoxia induced factors*, fatores de transcrição induzidos por hipóxia). Por ação do HIF inicia-se a síntese do VEGF, entre outras proteínas igualmente capazes de estimular as células endoteliais. Sob o estímulo do VEGF formam-se fenestrações na rede capilar e a permeabilidade vascular aumenta.

A ativação dos receptores tirosina-quinase é tipicamente iniciada pela ligação da molécula ativadora (por exemplo, hormônio ou fator de crescimento) no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação induz uma dimerização dos receptores, resultando na autofosforilação dos resíduos tirosina dentro do domínio citoplasmático,

onde o primeiro substrato deste domínio vem a ser o próprio receptor. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o VEGF promove a angiogênese não foram ainda desvendados. A ligação do VEGF aos seus diferentes receptores inicia diferentes vias de sinalização intracelular. Esta ligação leva à dimerização do receptor, uma autofosforilação de resíduos tirosina que conduzem à ativação da transdução de sinal de moléculas como fosfolipase Cy (PLCY), fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt/PKB), *Ras*, tirosina-quinases coativadoras de receptores esteroidais (Src) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A ativação de fosfolipase Cy (PLCy) leva à liberação de cálcio (Ca^{2+}) e ativação da proteína quinase C (PKC). Esta, por sua vez, estimula as vias Raf/MAPK/quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que aumentam a proliferação celular. A mobilização de Ca^{2+} e a ativação de PKC são a chave da sinalização da permeabilidade vascular induzida pelo VEGF por meio da ativação da atividade endotelial da síntese do óxido nítrico (MARTINS et al. 2002).

O controle da angiogênese é feito por meio da permeabilidade vascular que aumenta em resposta ao VEGF, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas que caminham entre as células endoteliais recém-migradas. As junções são formadas por meio de interações homofílicas entre as caderinas endotelial vascular, com estabilização intracelular do citoesqueleto de actina via interação β -catenina e α -catenina. Receptores tirosino-quinase podem induzir a fosforilação em tirosina da β -catenina e seus correlatos, levando ao aumento da migração celular e alteração da

permeabilidade vascular. A β -catenina, quando dissociada dos complexos juncionais, pode atuar como co-ativador transcripcional. A cicloxigenase 2 (COX2) permite a ligação entre a rede neoformada com a já existente e este processo de união é mediado por E-caderinas e as integrinas alfa e beta, promovendo a adesão molecular, finalizando assim o processo de neoangiogênese (MAHARAJ et al. 2006).

1.8 MARCADORES ANGIOGÊNICOS

1.8.1 O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o Fator de Crescimento Placentário (PIGF, do inglês *placental growth factor*), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F. O VEGF-A é uma citocina potente e multifuncional que exerce seu efeito no endotélio (VALIATTI et al. 2011).

O gene humano do VEGF-A está organizado em oito éxons, separados por sete íntrons e localizado no cromossomo 6p21.3. O *splicing* alternativo resulta em quatro isoformas principais, contendo 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Embora com menor frequência, outras variantes também têm sido relatadas, incluindo VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₆₂ e VEGF_{165b}. Paradoxalmente, esta última variante teria um efeito inibitório na mitogênese induzida pelo VEGF (VALIATTI et al. 2011).

Descrita tanto em processos fisiológicos, quanto em condições patológicas, é elucidada em duas situações principais: em tecidos que sofrem renovação ou modificações cíclicas e em situações de inflamação e reparo tissular autolimitados. O início da nova vascularização ocorre por meio da formação de brotos capilares que geralmente são compostos por uma ou duas células. Estes brotos podem formar um lúmen por meio da canalização intracelular que ocorre por meio de vesículas citoplasmáticas ou por um processo alternativo de canalização intercelular. O VEGF₁₈₉ promove a diminuição do lúmen vascular, enquanto o VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅ promovem a sua formação e, conseqüentemente, crescimento vascular (FOLKMAN et al. 1992).

1.8.2 VEGFR1 e VEGFR2

O VEGF induz a angiogênese, atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase. Eles são conhecidos como VEGFR-1 (*fms-like tyrosine kinase 1* ou Flt-1) localizado no cromossomo 13q12.3 e VEGFR-2 (*fetal liver kinase*, Flk-1 ou KDR) e são expressos nas células do endotélio vascular. Estes receptores têm diferentes propriedades físicas, biológicas e possuem atividade tirosina quinase (TK). As proteínas tirosina quinase (PTK) são enzimas que catalizam a transferência do grupo fosfato da adenosina tri-fosfato (ATP) para resíduos tirosina de outras proteínas ou polipeptídios (KALITIN et al. 2012; DELLINGER et al. 2013).

1.8.3 CD34

O CD34 é uma glicoproteína e funciona como fator de adesão celular, localizada no cromossomo 1q32.2, atua mediando a ligação de células-tronco hematopoéticas à matriz extracelular ou às células do estroma. Utiliza-se a denominação *CD34* também para identificar o gene que codifica tal proteína. O CD34 é expresso tanto em pequenos quanto em grandes vasos e a intensidade de marcação é igual tanto nos tecidos normais como nos neoplásicos (MARTINS et al. 2002).

1.8.4 CD31

Localizada no cromossomo 17q23.3, considerada uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície de plaquetas, monócitos, granulócitos, linfócitos B e na junção intercelular endotelial. A molécula possui um domínio extracelular que medeia o contato e a adesão célula-célula endotelial, estabilizando a monocamada de células endoteliais (HE et al. 2013).

1.8.5 CD105

Uma endogлина importante utilizada no estudo é a CD105, considerada glicoproteína de membrana endotelial homodimérica localizada no cromossomo 9q34.11, contém uma seqüência peptídica para receptores de adesão da família das integrinas. Este marcador é expresso em células endoteliais de capilares, arteríolas, vênulas e em diversos tecidos. A grande vantagem deste marcador em relação aos pan-endoteliais, está em reagir

preferencialmente com vasos ativados ou em proliferação, ou seja distinguindo estes da vasculatura pre-existente no tecido em estudo (EL-GOHARY et al. 2007).

1.8.6 D2-40

Será utilizado o D2-40 (sialoglicoproteína/ 1p36.21) como marcador eficaz e específico do endotélio linfático. Marca seletivamente o endotélio linfático e não reage com o endotélio vascular, fazendo assim um comparativo entre vasculogêneses e linfanogênese. Quando o anticorpo Anti-D2-40 é utilizado em conjunto com marcadores de endotélio vascular, auxilia na diferenciação entre invasão linfática e vascular (BAI et al. 2013).

1.8.7 p16INK4a

Localizada no cromossomo 9p21.3, a p16, membro da família INK4, é um importante supressor de tumor e já bastante descrito em carcinomas. Ela atua inibindo a progressão do ciclo celular e por isso quando está ausente permite um aumento na fosforilação de pRb com subsequente liberação do fator de transcrição E2F. Este processo pode ocorrer por diminuição da expressão ou mesmo por mutações nesta proteína. A expressão de p16 está fortemente associada à infecção por HPV (CUBILLA et al. 2007).

1.9 ANGIOGÊNESE NO PROCESSO TUMORAL

Em 1971, FOLKMAN et al. difundiram o termo angiogênese para nomear o processo complexo em que são formados novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. Eles isolaram um fator em tumores humano denominado *tumor angiogenesis factor* (TAF) que demonstrou atividade mitogênica às células endoteliais, estimulando a rápida formação de novos capilares. Estas observações propuseram que a angiogênese seria um pré-requisito para o crescimento neoplásico e não um efeito colateral deste. Assim surge a idéia de que o TAF seria um elemento produzido pelas células tumorais e que a sua inativação poderia ter grandes aplicações terapêuticas.

A expressão do fenótipo angiogênico, a partir de um subgrupo de células tumorais, demarca duas fases do desenvolvimento neoplásico: pré-vascular e vascular: A primeira fase, pré-vascular é caracterizada pelo diâmetro restrito do tumor (entre 2 a 3 mm) e limitação da população celular (< 10⁶ células). A população celular é mantida por difusão de O₂ e nutrientes através do espaço extracelular. A ausência de angiogênese impede a expansão do carcinoma *in situ* ou das micrometástases quiescentes, independente da capacidade de replicação celular, há um equilíbrio entre a proliferação e apoptose celular. Estas lesões são assintomáticas e clinicamente indetectáveis. A segunda fase, vascular caracteriza-se pela formação de novos vasos capilares e rápida proliferação celular neoplásica. O crescimento neoplásico requer novos capilares e a perfusão passa a ser o

mecanismo de aporte de oxigênio, nutrientes e via de eliminação de metabólitos. A maioria dos tumores torna-se clinicamente detectável somente após a neovascularização. Durante a atividade angiogênica tumoral, um ou mais fatores pró-angiogênicos são liberados pelas células tumorais, difundindo-se através dos tecidos e, alcançando a rede vascular adjacente, desencadeando uma sequência de eventos (ESPINOZA et al. 2013). Fatores pró e antiangiogênicos são sumarizados no Quadro 5.

Quadro 5 - Fatores pró-angiogênicos e inibitórios da angiogênese

Peptídeos de ação pró-angiogênica	Peptídeos inibidores da angiogênese
VEGF (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i> , fator de crescimento endotelial vascular)	Angiostatina
FGF (do inglês, <i>fibroblast growth factor</i> , fator de crescimento de fibroblasto)	Endostatina
EGF (do inglês, <i>epidermal growth factor</i> , fator de crescimento epidermal)	Tumistatina
PDGF (do inglês, <i>platelet-derived growth factor</i> , Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas)	Trombospondina-1
Leptina	Interleucina-12
Angiogenina	Interferon alfa
PIGF (do inglês <i>placental growth factor</i> , fator de crescimento da placenta)	Fator plaquetário-4
Osteopontina	Análogo de fumagalina
Proliferina	Tetrahydrocortisol

O processo de progressão tumoral da geração de uma célula neoplásica ao estabelecimento de metástases à distância, caracteriza-se por alterações cumulativas no material genético das células em transformação, essas alterações são traduzidas, por exemplo, na perda do controle sobre a

divisão celular, na imortalização e na aquisição da capacidade invasiva (ESPINOZA et al. 2013).

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e ao VEGF, degradação da membrana basal por metaloproteinases, perda das junções entre as células endoteliais pela ação do fator ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação, remodelamento e recrutamento de células periendothelias (SAMPLES et al. 2013).

Estudos sobre a neovascularização utilizam parâmetros para quantificar esses novos vasos. A densidade microvascular (MVD), pode ser definida como um valor médio de contagem de vasos, obtido, por meio de uma metodologia historicamente pouco consensual, isto é, variável de estudo para estudo. Na maioria dos estudos, são contadas estruturas microvasculares intra-tumorais em áreas de maior concentração vascular (“hotspots”), fora de áreas escleróticas ou de necrose. Define-se como “microvaso”, qualquer estrutura vascular, representada em secção transversal, longitudinal ou tangencial, que se apresente nitidamente separada de outras estruturas semelhantes. A área microvascular total (TVA) pode ser definida como a área ocupada por microvasos por unidade de área de tumor, obtida com a utilização de um microscópio dotado de objetiva (com aumento específico e diâmetro de campo conhecido), em um número limitado de campos (geralmente, 3 ou 4), subjetivamente

selecionados em áreas de maior vascularização (“hotspots”) (BAIGENT et al. 2013).

Nos estudos iniciais de quantificação de angiogênese, a vasculatura era avaliada morfológicamente em cortes histológicos corados em H&E. Com o advento da imunistoquímica, vários marcadores têm sido utilizados para revelar os microvasos. Dentre os marcadores mais comumente empregados, destacam-se: o CD34 e a molécula CD31/PECAM-1. Estes marcadores são chamados em conjunto de “pan-endoteliais”. Em paralelo, outra classe de marcadores vasculares mais recentemente descrita é a dos marcadores de “endotélio ativado e/ou em proliferação”, sendo o representante mais conhecido o CD105 (endoglina) (EL-GOHARY et al. 2007)

Na forma patológica, os vasos neoformados são ramificados e distribuídos de maneira irregular com formação de “shunts” arterio-venosos sem padrão hierárquico. Além disso, seu funcionamento é bastante diferente dos neovasos presentes em fenômenos fisiológicos. Para que haja proliferação celular e crescimento tissular é fundamental que as células envolvidas sejam capazes de realizar trocas com o seu microambiente, isto é, possam receber minimamente O₂, nutrientes e substâncias moduladoras e eliminar suas excretas (CARMELIET et al. 2005).

A ligação entre a angiogênese e a proliferação tumoral está associada entre atividade proliferativa tumoral e aumento na densidade intra-tumoral de microvasos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar esta observação. Por exemplo, algumas mutações gênicas envolvidas no

favorecimento da proliferação celular, como as mutações dos genes TP53, inclusive fazendo um paralelo com o HPV, uma vez que ele atua com bastante eficiência nesse gene e sua proteína, a p53 e *Hras*, também estão associadas à inibição de fatores anti-angiogênicos (como a trombospondina-1, relacionada especificamente à mutação do p53) ou ao estímulo à produção de efetores pró-angiogênicos (como o VEGF, relacionado a mutações de ambos os genes mencionados). Tumores malignos geralmente se apresentam em condições de hipóxia, em decorrência do grande consumo de oxigênio relacionado à proliferação celular e do aumento de pressão tissular. Esta hipóxia, por sua vez, estimularia a produção de fatores pró-angiogênicos como o VEGF, o fator de crescimento fibroblástico básico e o fator de crescimento derivado de plaqueta. Ou seja, quanto maior o crescimento tumoral, maior a hipóxia e quanto maior a hipóxia, maior a proliferação vascular que, por sua vez, trás consigo a nutrição necessária para subsidiar mais crescimento tumoral. Para que o novo vaso seja formado e tenha funcionalidade primária será necessário adesão celular à respectiva membrana basal endotelial, sendo crucial neste processo a intervenção das moléculas de adesão, que se incluem em quatro famílias principais: Integrinas, Selectinas, Caderinas e a superfamília das Imunoglobulinas (CARMELIET et al. 2005).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A angiogênese representa um tema não previamente explorado entre pacientes com CaPe positivos e negativos para o HPV de alto risco. O conhecimento mais acurado sobre a angiogênese nesta neoplasia pode contribuir para a compreensão do papel do vírus na sua patogênese, além da potencial implicação terapêutica, como na indicação de drogas moduladoras da angiogênese.

O objetivo do presente estudo é avaliar se há diferenças nas características imunomorfológicas da microvasculatura entre casos de CaPe positivos/alto risco e negativos/baixo risco para o HPV, verificando assim se a infecção viral potencializa o crescimento vascular.

2.1 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Verificar a área vascular através dos marcadores (CD31, CD34 e CD105) e sua relação com a infecção para o HPV
- Através do marcador D2-40, verificar se a linfangiogênese também sofre influência pela infecção por HPV
- Verificar a expressão protéica nas células tumorais de VEGF, e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 e comparar se a expressão protéica do p16 através da imunohistoquímica confere similaridade com a genotipagem por PCR no sentido de se detectar casos positivos para o HPV de alto risco.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center sob o número 1369/10B e é um subprojeto do temático “O carcinoma de pênis: estudo de um problema brasileiro, abordando da morfologia aos mecanismos moleculares”.

Foram incluídos neste estudo retrospectivo, 60 pacientes (27 HPV positivo alto risco e 33 HPV negativo/baixo risco – sendo 30 negativo e 3 baixo risco) com diagnóstico de carcinoma de células escamosas de pênis, que realizaram cirurgia no A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, no período de 1954 até 2010. Os tecidos tumorais fixados e incluídos em parafina deviam estar disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da instituição, para a realização das reações imunohistoquímicas descritas. Além disto, os casos deviam ter sua genotipagem de HPV definida pelo padrão ouro (PCR) para evitar resultados contraditórios. Blocos parafinados representativos do tecido tumoral foram selecionados para realização do estudo.

3.1 GENOTIPAGEM DO HPV

O procedimento para identificar o tipo de HPV nas 60 amostras foi realizado em estudos anteriores por pesquisadores do Instituto Ludwig (Dra. Luiza Lina Villa, Dra. Lara Termine e Maria Antonieta Andreoli). Foram

escolhidos blocos que continham amostras representativas do tumor e que estivessem em condições viáveis para a extração do DNA. Foram feitos cortes histológicos de 4 micrômetros, e coletados em microtubos. As amostras continham pelo menos 80% de células tumorais, previamente confirmado pela avaliação histológica. Os cortes foram desparafinados em xileno e reidratados em diluições decrescentes de etanol. O DNA foi extraído utilizando o protocolo estabelecido por SHI et al. (2002). A qualidade do DNA extraída foi avaliada pela amplificação do fragmento do gene da beta-globina por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), usando-se os *primers* PCO3+/PCO4+, tendo resultado em 110 pares de bases de DNA fragmentado.

Para detecção do HPV, utilizou-se a técnica de PCR, foram usados *primers* genéricos GP5+/GP6+, específicos para a região L1 do HPV. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 7%, seguido pela coloração prata. Foram considerados positivos quando se notava a presença de banda ao redor de 150 pares de base sobre a genotipagem por *dot blot* utilizando-se sondas radioativas. Um total de 17 tipos de HPV foi analisado: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56 e 58. Amostras com resultado duvidoso foram submetidas a PCR para HPV16.

3.2 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Cortes inteiros do tecido tumoral com 4 micrômetros de espessura foram colocados em lâminas com carga elétrica (StarFrost - Sakura) e mantidas em estufa a 60°C *overnight* para fixação adequada a lâmina. A reação foi feita manualmente.

Iniciou-se a técnica por meio da desparafinação das lâminas em três banhos subsequentes de xilol por 5 minutos cada. Após este passo, as lâminas passaram por banhos subsequentes de álcool, em concentrações decrescentes, até chegar a uma lavagem em água corrente por 5 minutos. Procedeu-se, então, à recuperação antigênica em banho-maria a 96°C por quarenta minutos em solução FLEX pH alto (Dako, Carpenteria, CA, USA) diluído na proporção de 1470 ml de água destilada com 30 ml da solução FLEX. Ao término deste processo, as lâminas foram esfriadas na própria solução até temperatura ambiente, por vinte minutos e, em seguida, foram lavadas em água corrente por mais cinco minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada a 3% em duas incubações de cinco minutos cada. A lavagem em tampão (100 mL concentrado 20x + 1900 mL de água destilada) foi feita em seguida, por duas vezes de 5 minutos cada.

Foi, então, aplicado 100µL de cada anticorpo primário sobre os cortes (vide Quadro 6), incubado por 20 minutos, lavado com tampão, e novamente incubado com sistema revelador Envision FLEX/HRP Dako (20 min). Após

nova lavagem em tampão, foi aplicado o cromógeno diamino-benzidina por 2 minutos.

Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, contracoradas com hematoxilina por um minuto e diferenciadas rapidamente em uma solução de 250mL de água destilada em 250 mL de álcool 99,5 GL com 27 gotas de ácido clorídrico. Então, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em gradiente crescente de álcool, diafanizadas em xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film - Sakura).

Quadro 6 - Anticorpos utilizados para a reação de imunoistoquímica.

Proteína	Clone	Fabricante	Diluição	Padrão de marcação
CD34	QBEnd10	DAKO, Carpenteria, CA, USA	1:250	Citoplasma*
CD31	JC70A	DAKO, Carpenteria, CA, USA	1:50	Citoplasma*
CD105	SN6h	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	1:50	Citoplasma*
D2-40	D240	DAKO, Carpenteria, CA, USA	1:100	Citoplasma* (endotélio linfático)
VEGF	VF1	DAKO, Carpenteria, CA, USA	1:50	Citoplasma#
VEGFR1 e 2	Policlonal	Neomarkers, Fremont, California, USA	1:25	Citoplasma#
P16	16P07	Neomarkers, Fremont, California, USA	Pronto para uso	citoplasma e núcleo

* marcação em células endoteliais vasculares sanguíneas e linfáticas; # células endoteliais e neoplásicas.

3.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS PREPARADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

As lâminas referentes a todos os casos foram escaneadas utilizando-se o ScanScope® XT, Aperio Digital Pathology System – Aperio, Vista, CA, USA. Por meio de escaneamento, imagens digitalizadas de todas as lâminas foram obtidas, permitindo a análise morfológica digital computadorizada de todos os casos. Para a análise destas imagens empregamos o sistema de patologia digital da Aperio (Aperio ImageScope™, version 10.02.02.2317), que é o sistema de análise de imagens digitais obtidas a partir do escaneamento das lâminas. Este sistema permite que as imagens digitais obtidas sejam analisadas por meio de algoritmos customizados.

Para a avaliação da formação vascular aplicamos o algoritmo Microvascular Density v1. Este parâmetro foi usado para os marcadores endoteliais: CD34, CD31, CD105 e D2-40.

Para tanto, áreas com maior número de vasos distintos (“hot spots”) foram identificadas no aumento de 100x e marcadas através de ferramentas de seleção milimetradas, células endoteliais isoladas ou grupos delas, com ou sem lúmen, foram considerados como vasos individuais.

Dentre todos os índices fornecidos pelo aparelho, foram selecionados 3 padrões para serem analisados:

- Microvessel Density (um²), MD (densidade microvascular);
- Mean Vascular Area (um²), MVA (área vascular média);
- Median Vascular Area (um²), MdVA (área vascular mediana).

Para determinar a expressão dos demais marcadores (VEGF, VEGFR1 e VEGFR2) foi utilizado ao algoritmo “positive pixel count v9”, PPC (contagem dos pixels positivos), sendo considerada a positividade por meio da razão entre os pixels positivos e o número total de pixels da imagem. Esse algoritmo interpreta o resultado por meio da quantidade de pixels, que refletem a intensidade de marcação. Considera-se uma intensidade definida pelo observador como “positiva”. O sistema utiliza-se de cálculos matemáticos já configurados no aparelho para a interpretação e conversão do resultado em números que variam de 0,000001 até 10,00000. Após fornecer o resultado, o número total foi anotado e convertido para uma sequência com apenas duas casas decimais, facilitando assim o procedimento estatístico. A avaliação do anticorpo p16 foi feita por meio da avaliação visual, seguindo os critérios de positividade elaborado por CUBILLA et al. (2007).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste utilizado foi o de Mann-Whitney (U), indicado para comparação de dois grupos não pareados a fim de verificar se pertenciam ou não à mesma população e cujos requisitos para aplicação do teste t de *Student* não foram cumpridos. Este teste verificou se houve evidências para acreditar que valores de um grupo A são superiores aos valores do grupo B. O teste U pode ser considerado a versão não paramétrica do teste t, para amostras independentes. Ao contrário do teste t, que testa a igualdade das médias, o teste U testa a igualdade das medianas. Os valores de U calculados pelo teste avaliam o grau de entrelaçamento dos dados dos dois grupos após a ordenação. A maior separação dos dados em conjunto indica que as amostras são distintas, rejeitando-se a hipótese de igualdade das medianas. Por meio deste teste determinou-se os valores de “p”, sendo considerado estatisticamente significativo quando “p” for $<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

5.1.1 Dados demográficos

Dos pacientes com carcinoma de pênis incluídos neste trabalho, a média de idade foi de 55,83 anos, com extremos de 24 a 81 anos, houve um número maior de casos HPV+ nos pacientes com idade inferior a 60 anos, ou seja 28%, enquanto 23 (38%) foram classificados como HPV-. Em relação à etnia, 41 (68%) eram caucasianos, 15 (25%) negros, 2 orientais e 2 não classificados (3,5% cada) sendo tipados os caucasianos com 21 (35%), contra 6 (10%) negros, ambos HPV+. A maior parte dos pacientes eram casados (46, ou 77%), sendo que 24 (40%) são HPV+, enquanto solteiros e de estado civil não informado correspondiam, cada um dos dois grupos, a 7 (11,5%) ou em relação ao HPV, eram positivo/negativo <10% (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos dos 60 pacientes portadores de carcinoma de pênis provenientes do A.C. Camargo Cancer Center e segundo status do HPV

Dados demográficos	Número total de pacientes	Porcentagem	HPV + N(%)	HPV – N(%)
Idade				
>60 anos	18	30	12(20)	6(10)
<60 anos	40	67	17(28)	23(38)
Idade não inf.	2	3	1(2)	1(2)
Etnia				
Branca	41	68	21(35)	20(33)
Negra	15	26	6(10)	7(12)
Amarela	2	3	1(2)	1(2)
Não classificado	2	3	1(2)	1(2)
Estado Civil				
Casado	46	78	24(40)	22(37)
Solteiro	7	11	2(3)	5(8)
Não informado	7	11	4(6)	3(5)

5.1.2 Dados clínicos

Dentre os sintomas relatados pelos pacientes na primeira consulta, 53 (88%) apresentavam ferida no pênis, seguido de dor 13 (21%) e prurido 7 (12%). Dezesesseis (27%) apresentaram antecedentes venéreos e 25 (42%) não referiam esse antecedente. Trinta e sete (62%) dos pacientes não haviam efetuado nenhum procedimento, 18 (30%) haviam sido submetidos a biopsia e 3 (5%) haviam sofrido amputação do pênis. A Tabela 9 agrupa os dados clínicos de relevância para o estudo.

A topografia tumoral mais comum foi o sulco balanoprepucial, com 34 pacientes (56%), seguida pelo prepúcio (16 pacientes, 27%) e glândula/corpo (1 cada, 2%). A cirurgia mais indicada foi a amputação parcial (34 casos, 56%), seguida por amputação total (21 casos, 37%). Não houve pacientes

com metástases distantes. Três pacientes estavam no estágio T1 (35%), 22 em T2 (37%), 30 em T3 (50%), 3 em T4 (5%) e de 2 o estágio não foi obtido. Não havia linfonodos comprometidos em 26 pacientes (N0, 43%); 15 pacientes apresentaram estágio N1 (25%), 17 N2 (29%), nenhum N3 e de 2 pacientes o status linfonodal não foi obtido. A média de evolução dos pacientes foi de 13,21 meses, sendo o menor de 1 mês e o maior de 60 meses. Dezesete pacientes (29%) apresentaram recidiva, sendo 13 (21%) regional, 3 (5%) no pulmão e coto cirúrgico, 1 (2%) nos ossos. 40 (67%) pacientes não houve recidivas, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Dados clínicos dos 60 pacientes portadores de carcinoma de pênis provenientes do A.C. Camargo Cancer Center e segundo status do HPV

Dados clínicos	Números de pacientes	Porcentagem	HPV + N(%)	HPV – N(%)
Sinais/sintomas				
Ferida	53	88	28(47)	25(42)
Dor	13	21	8(13)	5(8)
Inflamação	4	7	4(7)	0(0)
Disúria	3	5	3(5)	0(0)
Prurido	7	12	3(5)	4(7)
Outros	9	15	5(8)	4(7)
Ignorado	3	5	2(5)	1(2)
Procedimentos anteriores				
Intacto	37	62	20(33)	16(27)
Biópsia	18	30	8(13)	10(17)
Amputação	3	5	1(2)	2(3)
Ignorado	2	3	1(2)	1(2)
Antecedentes venéreos				
Sim	16	27	8(13)	8(13)
Não	25	42	12(20)	13(22)
Ignorado	19	31	10(17)	9(15)
Postectomia				
Não	43	72	25(42)	18(30)
Relacionada com o câncer	4	7	1(2)	3(5)
Não Relacionada	5	8	1(2)	4(6)
Ignorado	8	13	3(5)	5(8)

Cont/ Tabela 2

Dados clínicos	Números de pacientes	Porcentagem	HPV + N(%)	HPV – N(%)
Topografia				
Glande	1	2	1(2)	0(0)
Prepúcio	16	27	9(15)	7(12)
Sulco balanoprepucial	34	56	16(27)	18(30)
Corpo	1	2	1(2)	0(0)
Ignorado	8	13	3(5)	5(8)
Cirurgia				
Amputação parcial	34	56	13(22)	21(35)
Amputação total	21	37	15(25)	6(10)
Emasculação	1	2	0(0)	1(2)
Ignorado	4	6	2(3)	2(3)
Estadiamento				
T				
T1	3	5	1(2)	2(3)
T2	22	37	12(20)	10(17)
T3	30	50	15(25)	15(25)
T4	3	5	1(2)	2(3)
Ignorado	2	4	1(2)	1(2)
N				
N0	26	43	11(18)	15(25)
N1	15	25	6(10)	9(15)
N2	17	28	11(18)	6(10)
N3	0	0	0(0)	0(0)
Ignorado	2	4	1(2)	1(2)
Recidiva				
Sim	17	29	9(15)	8(14)
Não	41	68	20(33)	21(35)
Ignorado	2	4	2(2)	2(2)
Local da Recidiva				
Coto	3	5	1(2)	2(3)
Regional	13	21	8(14)	5(7)
Pulmão	3	5	2(3)	1(1)
Ossos	1	2	0(0)	1(2)
Sem recidiva	40	67	13(22)	27(45)
Status no último segmento				
Vivo sem doença	28	46	11(18)	17(28)
Vivo com doença	4	7	1(2)	3(5)
Óbito por câncer	10	17	6(10)	4(7)
Óbito por outra causa	12	20	9(15)	3(5)
Não localizado	6	10	3(5)	3(5)

Dos 60 pacientes da amostra, 28 (47%) encontravam-se vivos e sem doença na última consulta, destes a maioria era HPV- (17 pacientes ou 28%), enquanto 4 (7%) estavam vivos com a doença sendo 1(2%) HPV+, 10

pacientes (17%) haviam falecido por câncer, predominando HPV+ com 10% dos óbitos e outros 12 (20%) foram a óbito por causas não relacionadas ao câncer sendo que a maioria 15% ou 9 pacientes eram HPV+ 6 pacientes (10%) não foram localizados, não há informação até o momento sobre o atual estado de saúde desses pacientes. A Tabela 3 exemplifica o *status* do paciente com relação a recidiva, local da recidiva e estadiamento.

Tabela 3 - Relação entre status, recidiva, local e estádios (T e N) relacionados com HPV dos 60 pacientes com câncer de pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Status	N(%)	Recidiva N	Sítio anat.	Estádio T	Estádio N	HPV+ N(%)	HPV- N(%)
Vivo sem doença	28(47)	1	1	T3	N0	11(18)	17(28)
Vivo com doença	4(7)	4	1/2	T3	N0/N1/N2	1(2)	3(5)
Óbito por câncer	10(17)	10	1/2/3	T2/T3	N0/N1/N2	6(10)	4(7)
Óbito por outra causa	12(20)	1	2	T1/T2/T3	N0/N1/N2	9(15)	3(5)
Não localizado	6(10)	1	1/2	T3	N2	3(5)	3(5)

*1-Coto, 2-Regional, 3-Pulmão e 4-Osso

5.1.3 Dados anatomopatológicos

O tipo histológico mais comum foi o carcinoma espinocelular usual, com 42 casos (66%), sendo 22(37%) HPV+, contra 18(30%) HPV- seguido pelo tipo “warty” (8 casos, 13% / 2(3%) HPV+ e 6(10%) HPV-), glandular (4 casos, 7%), *cuniculatum*, papilar, condiloma gigante, sarcomatóide e misto (2%). A borda de invasão foi infiltrativa em 41 casos (68%) sendo 18(30%) HPV+ contra 19(32%) HPV- e compressiva em 16 (27%) e 9 (15%) HPV+. Com relação ao grau histológico a maioria dos casos era de alto grau (32 casos, 53%) considerando 13(22%) HPV+ e 17(28%) HPV-. 15 intermediário

(25%) e 11 (19%) baixo grau. Com relação à infiltração dos corpos esponjoso e cavernoso, encontrou-se em 49 (82%) e 36 (60%) casos, respectivamente; estava ausente em 3 (5%) e 17 (28%) casos, respectivamente, ambos com maior número de casos em HPV-. Em 21 (35%) pacientes havia infiltração da uretra, comparando com a infecção por HPV seria 8(13%) HPV+ contra 12(20%) HPV- e em 26 (43%) esta era ausente. Invasão vascular foi detectada em 6 (10%) pacientes e não em 52 (87%). Invasão perineural estava presente em 19 casos (32%) e ausente em 39 (65%) a relação entre dados anatomopatológicos comparados com HPV encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados anátomo-patológico referente aos 60 pacientes portadores de carcinoma de pênis

Dados anatomopatológicos	Número de pacientes	Porcentagem	HPV + N(%)	HPV – N(%)
Tipo histológico				
Usual	42	66	22(37)	18(30)
<i>Warty</i>	8	13	2(3)	6(10)
Papilar	1	2	0(0)	1(2)
Condiloma gigante	1	2	1(2)	0(0)
Sarcomatóide	1	2	1(2)	0(0)
Glandular	4	7	2(3)	2(3)
<i>Cuniculatum</i>	2	3	1(2)	1(2)
Misto	1	2	0(0)	1(2)
Inclassificado	2	3	1(2)	1(2)
Borda				
Compressiva	16	27	9(15)	7(12)
Infiltrativa	41	68	18(30)	19(32)
Inclassificado	3	5	1(2)	1(2)
Grau				
Baixo	11	19	5(8)	6(10)
Intermediário	15	25	9(15)	6(10)
Alto	32	53	13(22)	17(28)
Inclassificado	2	3	1(2)	1(2)
Corpo Esponjoso				
Negativo	3	5	2(3)	1(2)
Positivo	49	82	22(37)	25(42)
Inclassificado	8	13	6(10)	2(3)
Corpo Cavernoso				
Negativo	17	28	7(12)	8(13)
Positivo	36	60	17(28)	19(32)
Inclassificado	7	12	5(8)	2(3)
Uretra				
Negativo	26	43	11(18)	13(22)
Positivo	21	35	8(13)	12(20)
Inclassificado	13	22	8(13)	4(7)
Invasão Vascular				
Negativo	52	87	24(40)	21(35)
Positivo	6	10	5(8)	7(12)
Inclassificado	2	3	1(2)	1(2)
Invasão Perineural				
Negativo	39	65	18(30)	20(33)
Positivo	19	32	11(18)	8(13)
Inclassificado	2	3	1(2)	1(2)

Um total de 788 linfonodos foi extraído considerando média de 13,58. Houve casos em que foram extraídos 2, considerado o número menor, excluindo os que não tiveram nenhum linfonodo extraído e pacientes com a extração de 50. Desses 788 analisados, 45 foram positivos.

A infecção por HPV foi avaliada nos 60 casos, sendo 30 positivos e 30 negativos, conforme tabela abaixo.

Tabela 5 - Distribuição dos tipos de HPV em 30 casos positivos

HPV	Número de pacientes	%
16	20	67
18	3	10
35	1	3
6+11*	3	10
16+18	1	3
6+11+16	1	3
6+18+39	1	3

*Embora sejam dois subtipos de HPV (6 e 11) por ser baixo risco, foram considerados negativos.

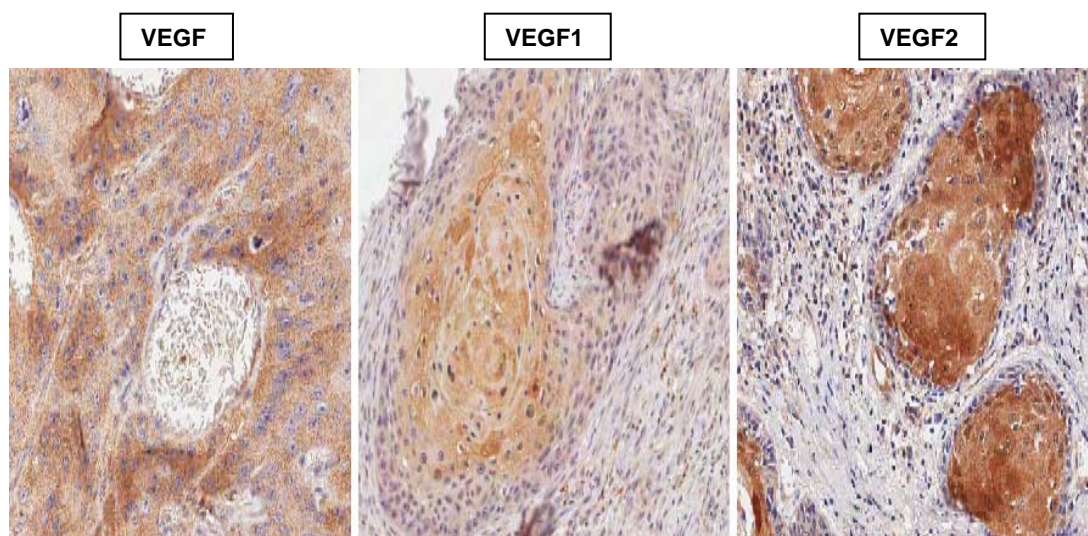
O tipo mais comum foi o HPV 16 considerado de alto risco com 20 (67%) dos 30 pacientes, logo em seguida o HPV 18 e a associação entre o 6 e 11 com 3 (10%).

5.2 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

As células neoplásicas apresentaram padrão de positividade citoplasmática para VEGF, VEGFR1 e VEGFR2.

Tabela 6 - Valores de mediana dos marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2

MARCADOR	MEDIANA
VEGF	0,36
VEGFR1	0,34
VEGFR2	0,86

**Figura 2** - Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetido a análise IHQ para a avaliação dos marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 (aumento 10X).

A Tabela 7 mostra o resultado estatístico obtido para a expressão dos marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 em carcinoma de pênis.

Tabela 7 - Resultado da análise estatística do VEGF, VEGFR1 e VEGFR2

Variável	VEGF	VEGFR1	VEGFR2
	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Idade	NS	NS	NS
HPV	NS	NS	NS
T	NS	NS	NS
N	<u>0,04</u>	<u>0,009</u>	NS
Borda	NS	NS	NS
Grau hist.	NS	NS	<u>0,05</u>
*C. Espon.	NS	NS	NS
*C. Cavern.	NS	NS	NS
Uretra	NS	NS	NS
*Inv. Vasc.	NS	NS	<u>0,003</u>
*Inv. Perin.	NS	<u>0,05</u>	<u>0,019</u>

NS = não significativo

Corpo esponjoso, Corpo Cavernoso, Invasão Vascular e Invasão Perineural

VEGF e VEGFR1 apresentou-se estatisticamente significativo para a variante “Estádio N” ($p=0,04$ e $p=0,009$) pacientes com estádios N>1 demonstraram ter maior expressão dos marcadores VEGF e VEGFR1 quando comparados com estadiamento N0.

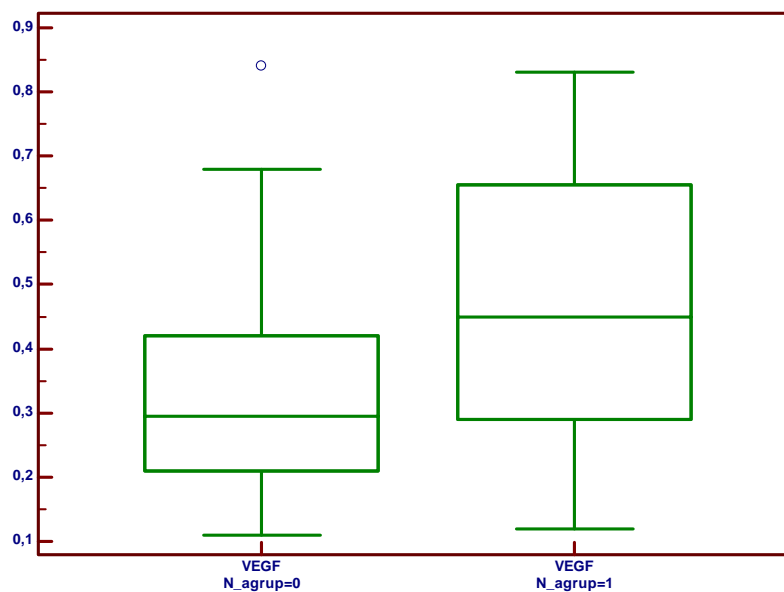


Figura 3 - Teste de Mann-Whitney para Estádio N (VEGF) classificado como “N_agrup=0” pacientes com N0 e “N_agruo=1” pacientes >N1 ($p=0,04$)

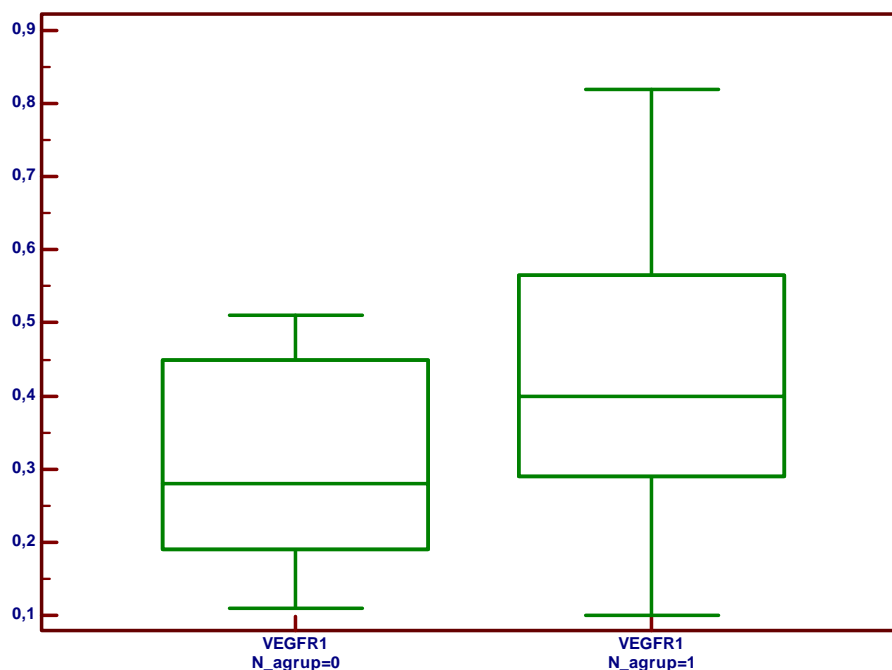


Figura 4 - Teste de Mann-Whitney para Estádio N (VEGFR1) classificado como “N_agrup=0” pacientes com N0 e “N_agruo=1” pacientes >N1 ($p=0,009$)

VEGFR1 também apresentou-se estatisticamente significativo para a variante Invasão Perineural ($p=0,05$). Pacientes que não tiveram invasão perineural demonstraram maior expressão do marcados quando comparados com pacientes positivos para a invasão.

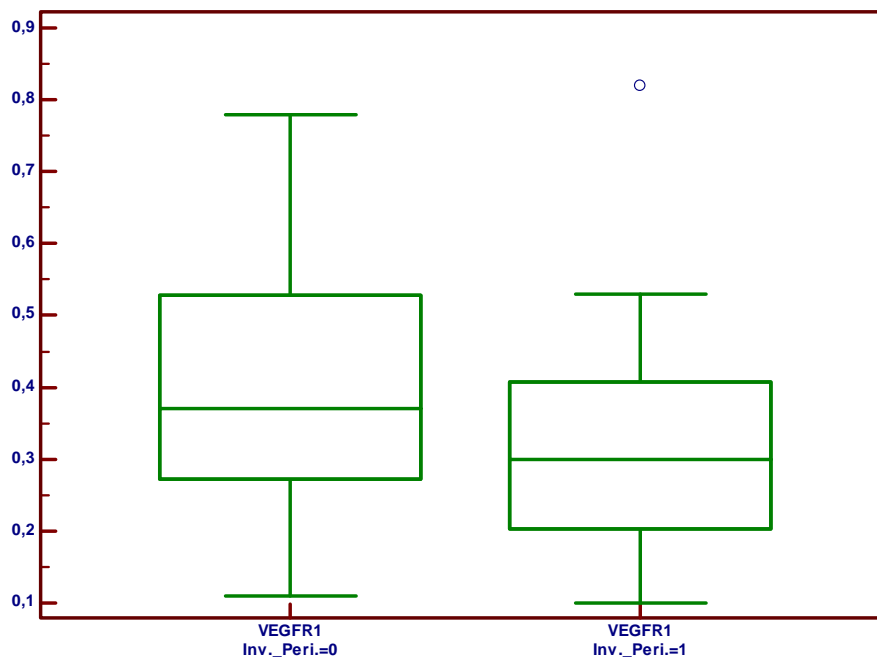


Figura 5 - Teste de Mann-Whitney para Invasão Perineural (VEGFR1). “Inv._peri=0” sendo negativo e “Inv._peri=1” positivo. ($p=0,05$)

VEGFR2 apresentou-se estatisticamente significativo para as variantes: Grau histológico ($p=0,05$), baixo ou intermediário grau demonstra maior expressão de VEGFR2 quando comparado aos pacientes alto grau. Invasão Vascular ($p=0,003$) e Invasão Perineural ($p=0,01$). Maior expressão em pacientes negativos para invasão (vascular e perineural).

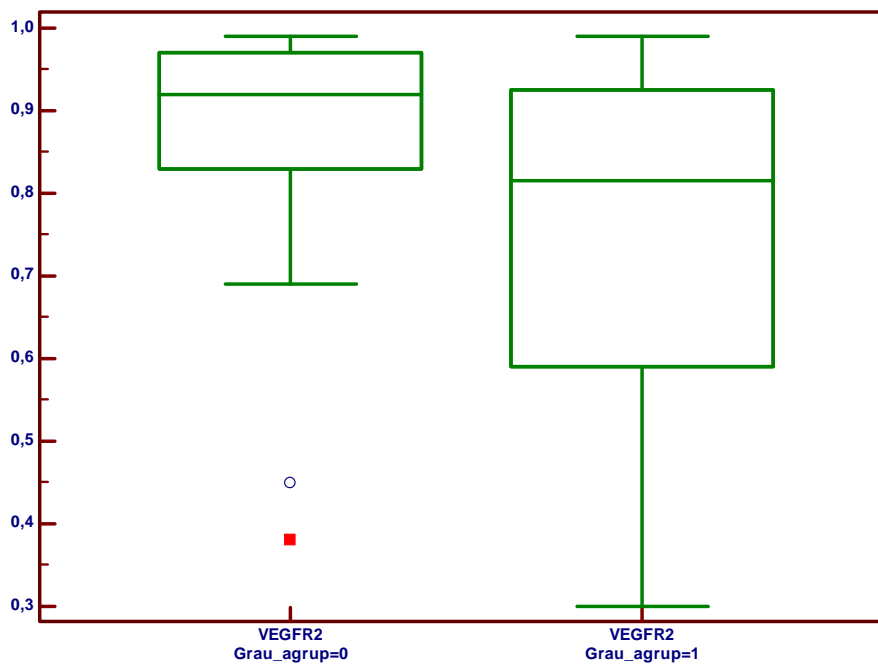


Figura 6 - Teste de Mann-Whitney para Grau Histológico (VEGFR2). “Grau_agrup=0” sendo baixo e intermediário e “Grau_agrup=1” como alto. ($p=0,05$)

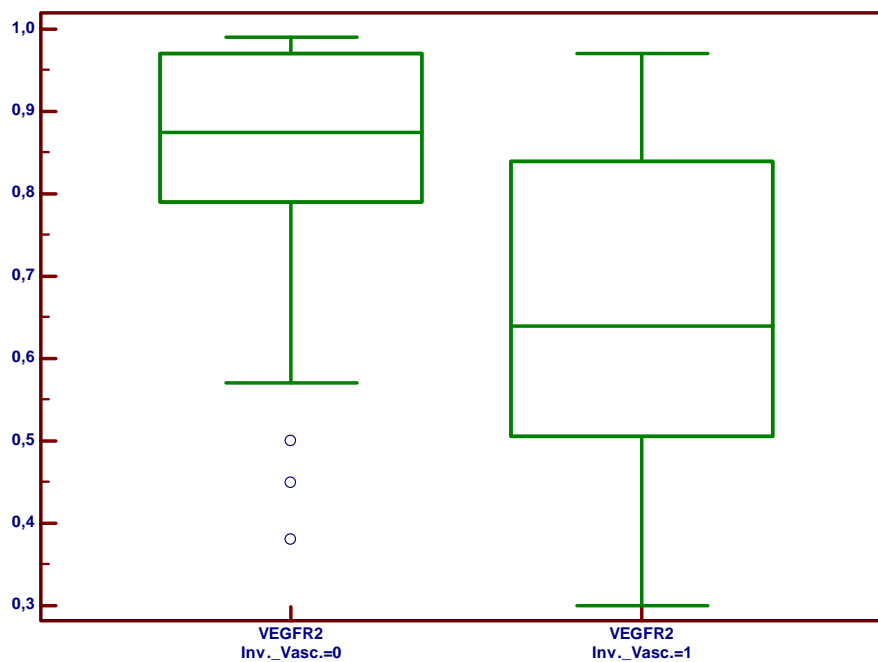


Figura 7 - Teste de Mann-Whitney para Invasão Vascular (VEGFR2). “Inv._Vasc=0” sendo negativo e “Inv._Vasc=1” positivo. ($p=0,003$)

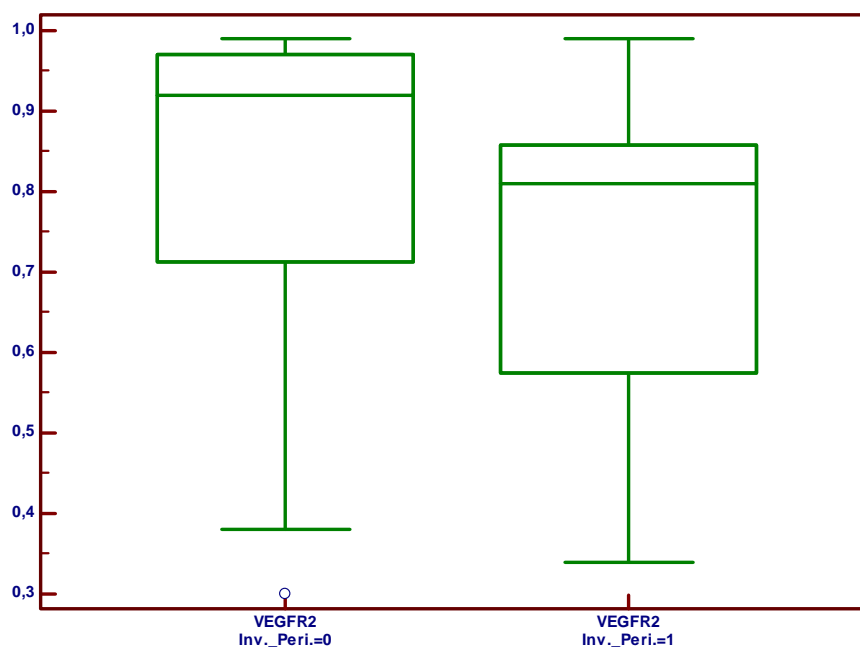


Figura 8 - Teste de Mann-Whitney para Invasão Perineural (VEGFR2). “Inv._peri=0” sendo negativo e “Inv._peri=1” positivo. ($p=0,01$)

A Tabela 8 mostra o resultado obtido para a marcação de p16 em amostras de carcinoma de pênis.

Tabela 8 - Resultado do p16 em positivo e negativo

Marcador	Positivo		Negativo	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
p16	19	32	41	68

Foram consideradas positivas amostras que tiveram o padrão forte de marcação, conforme Figura 9.

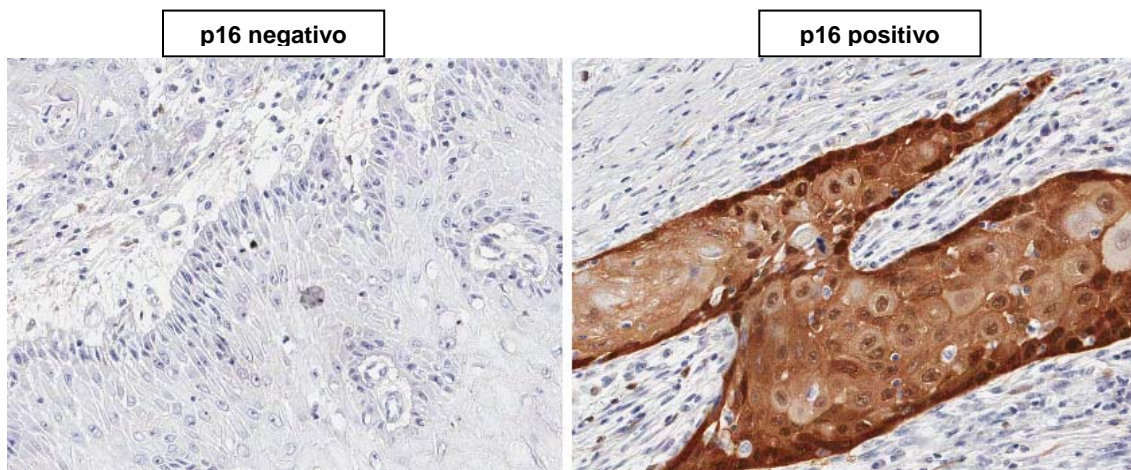


Figura 9 - Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetidos à análise IHQ para a avaliação do marcador p16 (aumento 10X).

Anticorpos com características de marcação de endotélio vascular sanguíneo.

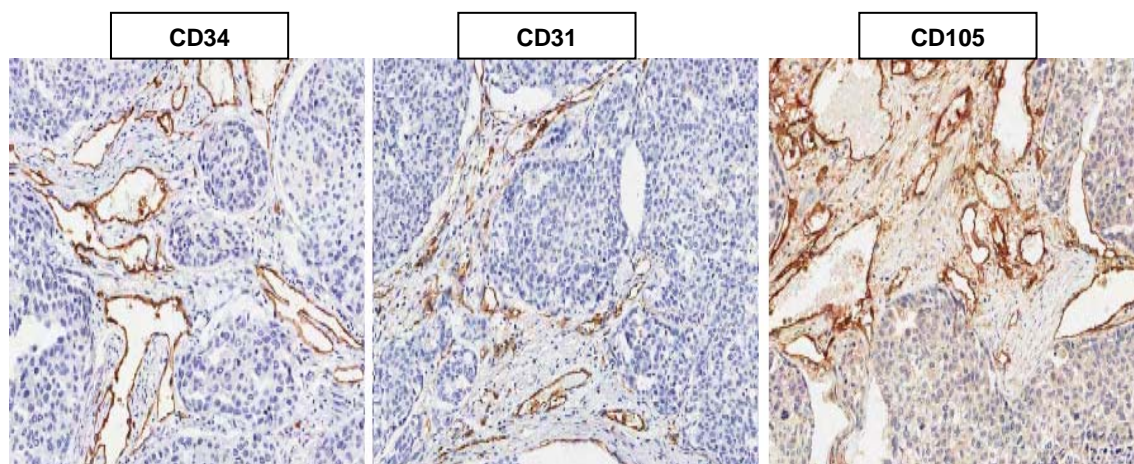


Figura 10 - Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetidos à análise IHQ para a avaliação dos marcadores CD34, CD31 e CD105 (aumento 10X).

D2-40 utilizado como marcação de endotélio linfático. Percebe-se que no tumor há evidência de marcação vascular linfática sem marcação vascular sanguínea, como pode ser verificada na imagem abaixo, nota-se a marcação vascular linfática positiva ao lado de um vaso sanguíneo negativo.

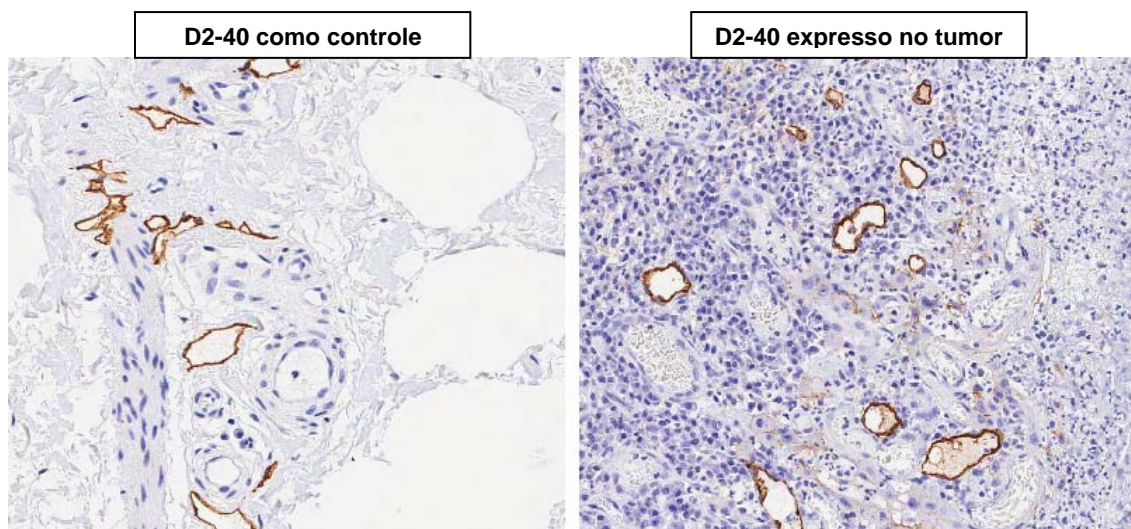


Figura 11 - Imagem obtida do corte histológico de carcinoma de pênis de pacientes provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, submetidos à análise IHQ para a avaliação do marcador D2-40 (aumento 10X), nota-se na primeira imagem a sensibilidade e especificidade do anticorpo, marcando o endotélio vascular linfático e não marcando o endotélio vascular sanguíneo. Já a segunda imagem mostra o anticorpo utilizado no tumor de pênis.

A Tabela 9 mostra o resultado obtido para a expressão dos marcadores CD34, CD31 e CD105 em carcinoma de pênis.

Tabela 9 - Resultado estatístico dos anticorpos CD34, CD31, CD105 e D2-40 para endotélio linfático.

CD34			
Variável	Densidade microvascular <i>P</i>	Área vascular média <i>p</i>	Área mediana vascular <i>P</i>
Idade	NS	NS	NS
HPV	NS	NS	NS
T	NS	NS	NS
N	NS	NS	NS
Borda	NS	NS	NS
Grau hist.	<u>0,001</u>	NS	NS
C. Espon.	NS	<u>0,05</u>	NS
C. Cavern.	NS	NS	NS
Uretra	NS	NS	NS
Inv. Vasc.	NS	NS	NS
Inv. Perin.	NS	NS	NS
CD31			
Variável	Densidade microvascular <i>P</i>	Área vascular média <i>P</i>	Área mediana vascular <i>P</i>
Idade	NS	NS	NS
HPV	NS	NS	NS
T	NS	NS	NS
N	NS	NS	NS
Borda	NS	NS	NS
Grau hist.	NS	NS	NS
C. Espon.	NS	NS	NS
C. Cavern.	NS	NS	NS
Uretra	NS	NS	NS
Inv. Vasc.	NS	NS	NS
Inv. Perin.	NS	NS	NS
CD105			
Variável	Densidade microvascular <i>p</i>	Área vascular média <i>P</i>	Área mediana vascular <i>P</i>
Idade	NS	NS	NS
HPV	NS	<u>0,05</u>	NS
T	NS	NS	NS
N	NS	NS	NS
Borda	NS	NS	NS
Grau hist.	NS	NS	NS
C. Espon.	NS	NS	NS
C. Cavern.	NS	NS	NS
Uretra	NS	NS	NS
Inv. Vasc.	NS	<u>0,04</u>	<u>0,005</u>
Inv. Perin.	NS	NS	NS

Cont/ Tabela 9

D2-40			
Variável	Densidade microvascular	Área vascular média	Área mediana vascular
	<i>p</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
Idade	NS	NS	NS
HPV	NS	NS	NS
T	NS	NS	NS
N	NS	NS	NS
Borda	NS	NS	NS
Grau hist	NS	NS	NS
C. espon.	NS	NS	NS
C. caver.	NS	NS	NS
Uretra	NS	NS	NS
Inv. vasc	NS	NS	NS
Inv. Perin	NS	NS	NS

NS = não significativo

CD34 apresentou-se estatisticamente significativo para as variantes: Grau histológico ($p=0,001$ – densidade microvascular- baixo/intermediário grau) com expressão superior aos caracterizadas como alto grau e Corpo Esponjoso ($p=0,05$ - área vascular média) sendo maior expressão em pacientes com comprometimento da estrutura.

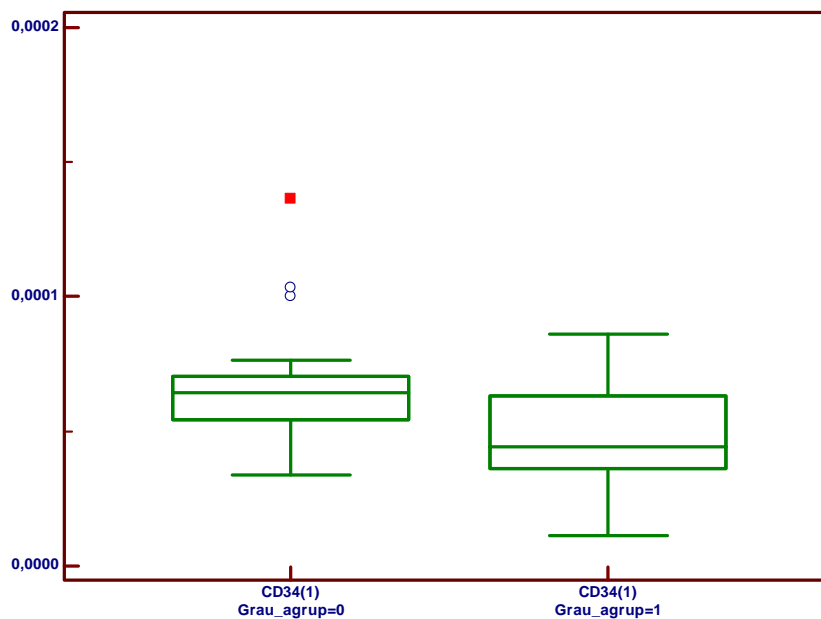


Figura 12 - Teste de Mann-Whitney para Grau Histológico (CD34). “Grau_agrup=0” sendo baixo e intermediário e “Grau_agrup=1” como alto ($p=0,001$).

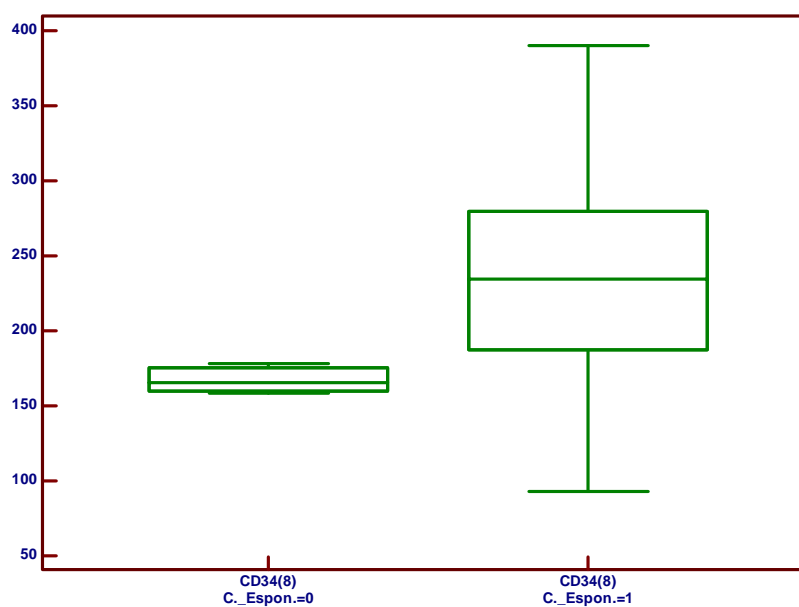


Figura 13 - Teste de Mann-Whitney para Corpo Esponjoso (CD34). “C_espon=0” sendo negativo e “C_espon=1” como positivo ($p=0,05$).

O marcador CD31 não apresentou significância estatística em nenhum dos parâmetros analisados

CD105 apresentou-se significância estatística para as variantes: HPV ($p=0,05$ – área média vascular), ou seja, pacientes HPV positivo alto risco têm maior área média vascular em comparação com HPV negativo/baixo risco. A variável Invasão Vascular ($p=0,04$ – área média vascular e $p=0,005$ – área mediana vascular), demonstrou que foi mais evidente em pacientes positivos para a invasão vascular quando comparados com pacientes negativos.

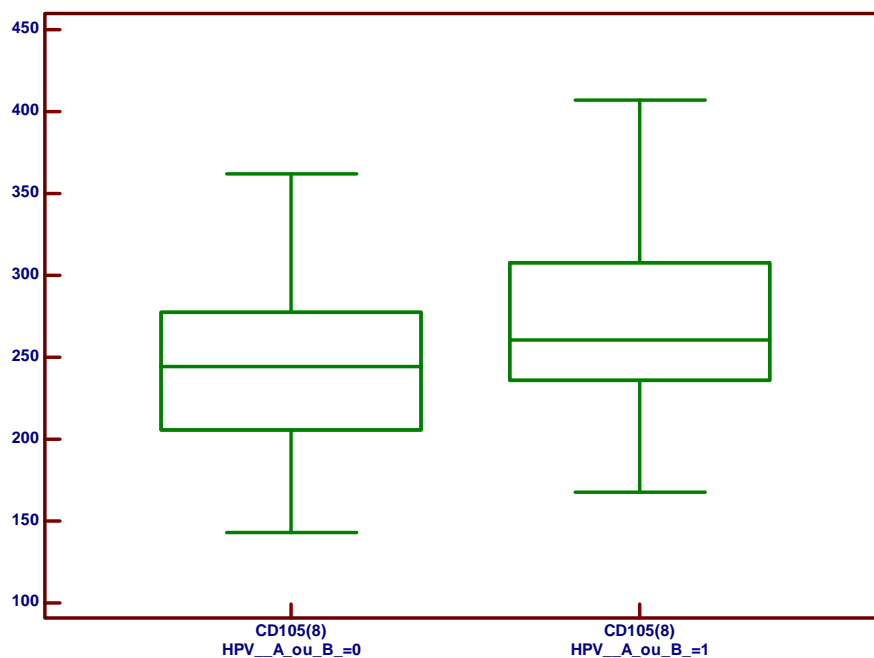


Figura 14 - Teste de Mann-Whitney para HPV (CD105). “HPV=0” sendo negativo ou baixo risco e “HPV=1” como alto risco ($p=0,05$).

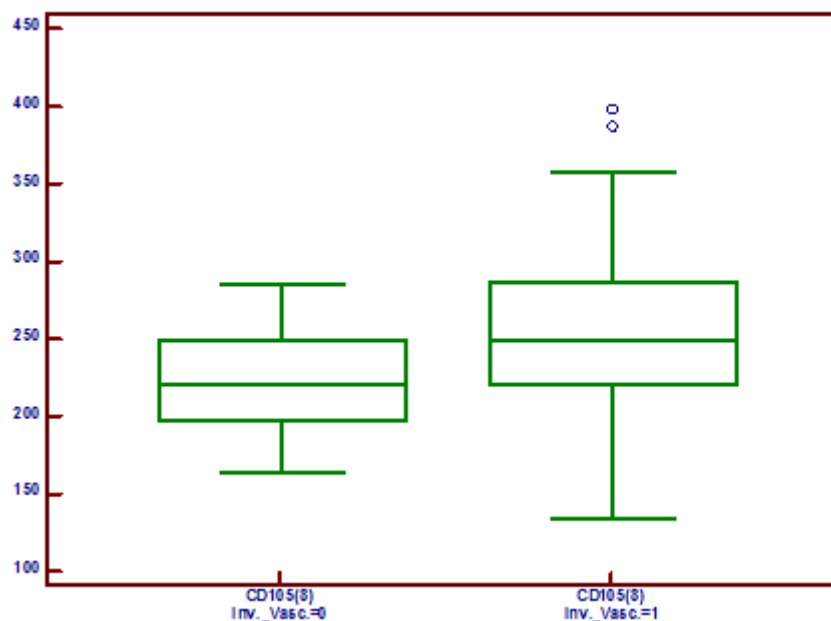


Figura 15 - Teste de Mann-Whitney para Invasão Vascular (CD105).
 “Inv._Vasc=0” sendo negativo e “Inv._Vasc=1” positivo ($p=0,04$).

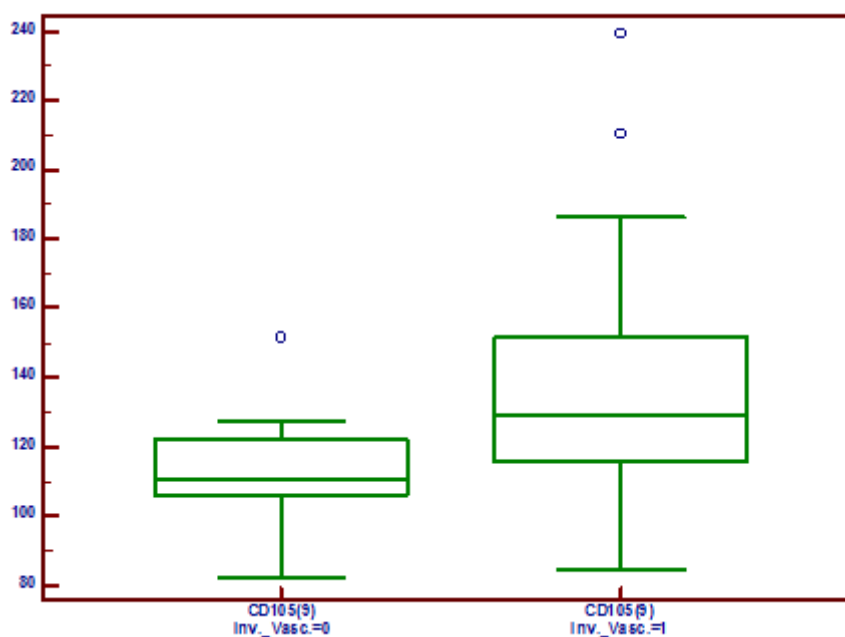


Figura 16 - Teste de Mann-Whitney para Invasão Vascular (CD105).
 “Inv._Vasc=0” sendo negativo e “Inv._Vasc=1” positivo ($p=0,005$).

Não houve significância estatística para o marcador D2-40.

6 DISCUSSÃO

O câncer de pênis é um tumor raro, com maior frequência em homens a partir dos 60 anos com pico de incidência aos 70 anos (PAULA et al. 2005; BLEEKER et al. 2009; CALMON et al. 2013), embora possa atingir também os mais jovens. No grupo estudado os dados encontrados sobre a média de idade dos pacientes foi 55,83, onde o mais novo diagnosticado com 24 anos e o mais velho com 81 anos. BLEEKER et al. (2009) faz referência a sintomas primários (como a ferida) para a detecção do câncer de pênis e um paralelo ao subtipo mais frequente, na casuística deste estudo o sintoma mais comum entre os 60 pacientes foi a ferida com 88% e o subtipo usual o mais frequente, sendo observado em 66% dos pacientes.

O tradicional modo de sobrevivência dos tumores necessita de crescimento celular desordenado e este aumento populacional de células requer migração e formação endotelial para a nova vascularização. O CD105 tem sido usado como marcador primordial quando necessita análises de densidade microvascular, área total vascular entre outros parâmetros. A sensibilidade e especificidade do CD105 tem sido demonstrada superior aos marcadores conhecidos e mais amplamente utilizados, como o CD34, CD31 e VEGF (FANG et al. 2013).

Quando a variável HPV foi analisado em conjunto com o CD105, notou-se uma associação significativa ($p=0,05$), onde pacientes HPV positivo/alto risco, demonstraram possuir uma área vascular média superior

aos pacientes HPV baixo risco/negativo. O processo de neovascularização é primordial para a sobrevivência do tumor (FANG et al. 2013).

Em um recente estudo publicado por HE et al. (2013) foi verificado que a oncoproteína E6/E7, do HPV alto risco, foca em HPV16 principalmente, tem fundamental importância no processo angiogênico, atuando diretamente com o HIF-1 α , os autores propuseram que o aumento populacional de células provocado pela acelerada proliferação induzida pelo HPV alto risco, tem ação direta por meio do HIF-1 α , fazendo com que haja maior indução da expressão de VEGF e conseqüentemente maior crescimento vascular.

A relação entre CD105 e aspectos clínicos-patológicos ainda não é difundida, não havendo publicação sobre esta relação (MIYATA et al. 2013). Quando dados como estadiamento, borda, grau histológico, corpo esponjoso e cavernoso, uretra e invasão perineural foram confrontados em carcinoma de pênis, não houve significância estatística, o que corrobora com os alguns trabalhos encontrados na literatura (DALES et al. 2003; EL-GOHARY et al. 2007; MIYATA et al. 2013).

A variável invasão vascular demonstrou significância estatística para dois critérios analisados: área média vascular ($p=0,04$) e área mediana vascular ($p=0,005$), pacientes com invasão vascular positiva tiveram maior AMV do que os pacientes negativos. A invasão vascular é um importante dado anátomo-patológico e tem sido investigada para entender o processo metastático, uma vez que está ligada diretamente com essa migração celular. FONSATTI et al. (2003) preconizaram a importância do marcador

CD105 ser uma endoglina de membrana que modula a angiogênese por meio da regularização da proliferação celular, diferenciação e migração.

BREWER et al. (2000), MARTONE et al. (2005) e MIYATA et al. (2013) demonstraram em seus estudos (trato urinário, cervical e cabeça e pescoço) que a associação CD105/neovascularização está diretamente ligada ao processo de invasão vascular e conseqüentemente metástase, esse dado realmente corrobora o encontrado no estudo, porém não há como verificar se pacientes com metástase possuem ou não maior vascularização e expressão do CD105, uma vez que não há grupos metastáticos no projeto.

A alta Densidade Microvascular (MD) é preditor de mau prognóstico em determinados tumores, incluindo carcinoma de bexiga (JAEGER et al. 1995; HAWKE et al. 1998), próstata (HALL et al. 1994; BETTENCOURT et al. 1998), rins (NATIV et al. 1998; YOSHINO et al. 1998) e pênis (FUKUDA et al. 1999). Entretanto não é um padrão e alguns estudos não encontraram relação significativa entre a MD e os resultados encontrados (DINNEY et al. 1998; RUBIN et al. 1999), enquanto outros estudos encontraram que a maior MD está relacionada com melhor prognóstico (KOHLENER et al. 1996; DELAHUNT et al. 1997).

Para que ocorra essa vascularização, o tumor precisa produzir seus substratos capazes de induzirem a formação de novos vasos e conseqüentemente a proliferação tumoral (FOLKMAN et al. 1992). Esses fatores favoráveis a angiogênese foram abordados no projeto por meio da expressão do VEGF, e seus receptores, VEGFR1 e VEGFR2.

Houve significância estatística para estágio N em VEGF ($p=0,04$) e VEGFR1 ($p=0,009$), pois pacientes que foram classificados como N0 (Ausência de linfonodo inguinal palpável ou visivelmente aumentado) tiveram expressão maior desses fatores em relação ao grupo >N1. Quando analisado o Grau Histológico foi significativo apenas para o receptor VEGFR2 ($p=0,05$), sendo pacientes com grau baixo ou intermediário apresentaram maior expressão do receptor em relação aos pacientes classificados como alto grau, este dado não está muito bem descrito na literatura sobre carcinoma de pênis, sendo escasso para discutir sobre. Um estudo proposto por EIFLER et al. (2012) sobre carcinoma gástrico observou associação inversa na expressão de VEGF comparando com estadiamento TNM, o teste utilizado foi ANOVA e verificou que pacientes com estadiamentos menores apresentaram maior expressão tecidual quando comparados com estádios mais avançados. Esta informação embora tenha sido feita com outro método estatístico corrobora com o resultado encontrado para carcinoma de pênis.

MUTSCHALL et al. (2009) em estudo de câncer de colorretal verificaram ausência de correlação significativa entre expressão tumoral de VEGF e seus receptores com estadiamento TNM, por outro lado autores como FUNAKI et al. (2003) e KAZAMA et al. (2004) demonstraram que existe uma relação significativa entre expressão tumoral do VEGF em relação a metástase, porém o atual estudo sobre carcinoma de pênis não contém na casuística pacientes com metástase, impossibilitando a comparação com outros trabalhos publicados a respeito.

Variáveis como invasão corpo cavernoso, corpo esponjoso e uretra, não demonstraram significância quando comparados com os marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2. RYU e SHU (2012) e KIM et al. (2013) demonstraram por meio de experimentos que a ação de determinados fármacos pode ser utilizados, como estimulador da angiogênese na disfunção erétil, mas não fizeram ressalvas ao processo tumoral nas estruturas penianas, embora na casuística haja grande quantidade de pacientes com essas estruturas comprometidas, não há dados na literatura que faça referência.

A invasão vascular demonstrou significância estatística ($p=0,003$) para o marcador VEGFR2, pacientes que não apresentavam invasão vascular tiveram maior expressão do marcador quando comparados com pacientes onde houve a invasão vascular, LU et al. (2012) demonstraram por meio de um estudo publicado que VEGF inibe a invasão tumoral através do complexo MET/VEGFR2, sendo esse MET um receptor tirosina kinase do HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) frequentemente desregulado em vários casos de tumor, promovendo proliferação celular. Esse estudo reforça a hipótese de que a expressão do VEGF em ação aos receptores, em especial o VEGFR2 atua como regulatório do processo angiogênico.

Outro paralelo estudado foi a invasão perineural, considerada como fator de pior prognóstico (GONZAGA-SILVA et al. 2012), demonstraram que houve significância estatística para os marcadores VEGFR1 ($p=0,05$) e VEGFR2 ($p=0,01$). Assim como foi verificado na invasão vascular, a significância foi relativa a pacientes na qual não houve invasão perineural. Estes pacientes tiveram expressão maior dos marcadores VEGFR1 e

VEGFR2 comparando os que tiveram a invasão. Este resultado gera um questionamento, pois neste estudo utilizou-se metodologias que não são frequentemente utilizadas, como o escaneamento por meio do aparelho Apério, pois nem todo centro possui um equipamento de grande porte como este. O teste Mann-Whitney, tem por base a análise da mediana, e não a média como a grande maioria dos estudos utilizam, esses fatores analisados torna o trabalho inovador, por estes motivos, podendo ocorrer certa divergência do que diz a atual literatura, sendo necessário estudos complementares para os resultados obtidos.

A invasão vascular, bem como a invasão perineural, não foram achados freqüentes, sendo observadas em 10% e 32% dos casos, respectivamente. Tais variáveis são conhecidas, junto à metástase linfonodal, como sinais de bom prognóstico quando ausentes em tumores e, portanto esse resultado demonstra uma doença menos agressiva para os pacientes em questão.

Para determinar a marcação vascular sanguínea, foram utilizados marcadores bem conhecidos e descritos na literatura como o CD34, CD31, CD105. A estimativa microscópica da densidade microvascular (MD) nos cortes histológicos dos tecidos, por meio do estudo imunoistoquímico com marcadores endoteliais é amplamente disponível em diversos departamentos de patologia, entretanto essa medida também pode ser realizada por meio de sistemas digitais de análise de imagens.

Um anticorpo bastante utilizado pelo mercado é o CD31, devido sua capacidade de marcar o endotélio vascular sanguíneo. No estudo

apresentado não houve significância estatística do marcador com os parâmetros utilizados, dados estes que corroboram com estudos como o de MONTEIRO-AMADO et al. (2013), em que utilizou-se o anticorpo CD31 para verificar a densidade microvascular em carcinoma bucal, onde não foi notado associação com a angiogênese. O estudo de VIACAVA et al. (2003) em adenomas, não notou significância estatística em relação a nova vascularização para o marcador em questão, avaliando a MD. Já em contraste a MD determinada pelo CD31 foi significativa para o estudo de LIVEZEANU et al. (2011) no qual demonstrou através da expressão do anticorpo a determinação da vascularização de pacientes portadores de pterígio, notou-se significância estatística comparando o CD31 com MD inclusive associando-o com a expressão do marcador VEGF, porém parâmetros como idade, não houve valor significativo.

HE et al. (2013) fazem referência a super expressão da oncoproteína E6/E7 do HPV16/18 potencializa a angiogênese, fato este já descrito anteriormente por CUBILLA et al. (2011); CHAUX e CUBILLA (2012). Porém em seu estudo realizado com outros marcadores angiogênicos como HIF-1a (Fator Indutor de Hipóxia) demonstrou que no carcinoma de pulmão HPV16 oncoproteína E6/E7 a angiogênese é dependente da expressão de HIF-1a e que esse subtipo de HPV potencializa a expressão do CD31 causando o processo de formação vascular, resultando assim na forte associação entre HPV e angiogênese.

A literatura sobre tal anticorpo é controversa, pois encontram-se muitos trabalhos sendo favoráveis a este marcador como também existem

outras dezenas de trabalhados demonstrando a não funcionalidade deste anticorpo. O processo de IHQ do marcador seguiu o mesmo protocolo dos demais, porém não foi verificado no tecido uma marcação significativa. A marcação foi fraca e incompleta na maioria dos locais selecionados (*hot-spots*), demonstrando ser um alvo não muito confiável para o estudo da angiogênese em carcinoma peniano. Regiões onde houve uma intensa marcação endotelial para anticorpos como CD34 e CD105 não demonstrou essa mesma marcação vascular em relação ao CD31, salve a excesso do marcador CD105 que foi utilizado como primordial para a neoangiogênese, mas mesmo assim este marcador tem o potencial de marcar endotélio já formado.

O anticorpo CD34 demonstrou ser de melhor marcação endotelial vascular quando comparado com o CD31, muito utilizado por pesquisadores quando o assunto é vasculogênese sanguínea. Este marcador demonstrou significância estatística para parâmetros como grau histológico ($p=0,001$). Os pacientes que apresentaram grau baixo ou intermediário demonstraram maior densidade microvascular em relação aos pacientes com grau histológico alto.

ZÄTTERSTRÖM et al. (1995) demonstraram por meio da expressão do CD34 em carcinoma oral que o grau da vascularização está associado diretamente com melhor sobrevida, diferente de RANIERI et al. (2001) que não demonstraram essa relação. AL-NAJAR et al. (2012) demonstraram que a MD por meio do CD34 está aumentada na área peritumoral, o que pode se relacionar com a invasão vascular e perineural, porém no atual estudo em

carcinoma de pênis, não houve significância estatística quando esses dois paralelos foram analisados. Quando estes mesmos autores analisaram em relação ao estadiamento TNM, foi verificado que pacientes classificados com T3 possuem maior MD quando comparados com estádios T1 e T2. Este dado diverge do encontrado em câncer de pênis, uma vez que 50% da casuística foi classificada com T3. Não houve relação estatística com o estadiamento TNM, porque a casuística foi menor, utilizando apenas 7 casos T3 contra 30 casos disponíveis neste estudo. Essa diferença (7 casos no estudo de AL-NAJAR et al. (2012) e 30 nesta dissertação) foi fator primordial para a divergência de resultados encontrados, talvez se fosse uma amostra maior de T3 o estudo de AL-NAJAR et al. (2012) não seria estatisticamente significativo.

Quando analisado invasão do corpo esponjoso, houve significância estatística ($p=0,05$), pacientes que apresentaram comprometimento dessa estrutura (82%) tiveram maior área média vascular em relação aos pacientes negativos. A literatura é escassa sobre a neovascularização tumoral em estruturas penianas, embora existam trabalhos relacionados com a disfunção erétil, inclusive como uma forma de tratamento seria a indução da angiogênese através de tratamentos com estimulação de VEGF nessas estruturas (RYU e SUH 2012; KIM et al. 2013). O CD34 tem sido um grande alvo para detecção desses vasos formados, pois suas características são bem descritas na literatura. O corpo esponjoso é biologicamente vascularizado, assim como o corpo cavernoso, porém um dos motivos pelo qual possivelmente não foi encontrada significância estatística para o

paralelo corpo cavernoso seja a diferença no número de casos positivos na casuística (diferença de 22% em relação ao corpo esponjoso).

Parâmetros como invasão vascular/perineural e uretral não demonstraram resultados estatisticamente significativos, não houve diferença entre pacientes com invasão e uretra comprometida quando comparados com pacientes negativos ou sem invasão. GONZAGA-SILVA et al. (2012) em um estudo com 172 pacientes com carcinoma invasivo de pênis relatam sobre a importância da invasão (vascular e perineural) estar ligada aos pacientes que tiveram pior prognóstico. CUBILLA et al. (2007) e ORNELLAS et al. (2008) demonstraram que a invasão vascular é um melhor fator preditor de metástase quando comparado com a invasão perineural, uma vez que para que ocorra a metástase é necessário migração celular por meio da corrente sanguínea, como na casuística não houve pacientes com metástase, não há como fazer essa associação, talvez um futuro estudo complementar possa demonstrar essa forte associação que é descritas pelos autores.

Segundo BRANCA et al. (2006) a expressão de VEGF e seus receptores também podem ser regulada pela expressão da oncoproteína E6 e pela perda de expressão de p53 selvagem. Os autores acreditam que esteja envolvido com o subtipo HPV16. Embora haja uma suposta relação entre a expressão de VEGF ser regulada também pela oncoproteína E6, ainda não há base científica o suficiente para comprovar essa hipótese, porém FEI et al. (2009) relatam que o HPV16 oncoproteína E6/E7 tem ação promotora de tumor em carcinoma uterino por meio da estimulação do

VEGF. Comparando a variável idade, estágio T e borda não houve significância estatística para os marcadores avaliados, mesmo resultado encontrado no estudo de FEI et al. (2009).

A infecção por HPV tida como a grande vilã dos carcinomas da região genital está presente em 27 dos 60 casos (levando em consideração apenas o de alto risco, ou seja, aquele que tem capacidade efetiva de provocar tumor) o teste Padrão Ouro para a detecção é a PCR, demonstra mais sensibilidade e especificidade para a detecção e classificação do subtipo (ARROYO et al. 2013).

A expressão de p16 é descrita como forte associação em pacientes HPV positivo (CUBILLA et al. 2011), isso devido uma proteína quinase dependente de ciclina que promove a passagem das células basais do estágio G1 para a fase S do ciclo celular. Em células funcionais p16 atua na inativação das quinases dependente de ciclina que fosforila a proteína do retinoblastoma e a acumulação de pRb inibe a ativação de p16. Quando as células são infectadas por HPV alto risco, estas produzem E7 que se liga à pRb levando a inativação do controle negativo de p16, ocorrendo assim a super expressão de p16, sendo este, motivo para a associação com o HPV (CARLSON et al. 2013).

Ao utilizar a técnica de IHQ para detecção de HPV por meio do marcador p16, a marcação precisa ser difusa e bem característica. Pacientes que contenham uma coloração fraca a moderada são considerados negativos para o marcador (CHAUX e CUBILLA 2012). Os resultados encontrados para a relação HPV positivo (feito por meio de PCR)

versus expressão de p16 (IHQ) não mostrou relação direta no carcinoma de pênis, sendo que dos 27 pacientes HPV positivo alto risco (detectado por PCR) apenas 19 (71%) demonstraram positividade. Portanto não é regra, uma vez que a inativação de p16 pode ocorrer por vários fatores como mutação, deleção e hipermetilação do gene (KLAES et al. 2001).

OLIVEIRA-COSTA et al. (2011) propuseram que a positividade do p16 pelo método de IHQ é variável de acordo com o subtipo histológico do carcinoma de pênis. O Warty mais frequentemente positivo que os demais, usualmente indeterminado. Na casuística não houve uniformidade no subtipo selecionado, devido aos critérios de inclusão, isso então sugere o fato de não ter ocorrido a expressão de p16 em 8 (29%) dos casos ou então alguma alteração no gene desses pacientes que impossibilitou a expressão de p16.

Em outros estudos como em carcinoma de cabeça e pescoço onde houve esse comparativo, os resultados não demonstraram relação direta, sendo considerado como um marcador não totalmente eficaz para a positividade do HPV (STEPHEN et al. 2013; RIETBERGEN et al. 2013; ROBINSON et al. 2013) o mesmo ocorre em carcinomas vulvares onde não há descrição de relação direta (LAVORATO-ROCHA et al. 2013; DEL PINO et al. 2013).

No contexto da avaliação prognóstica observamos que a infecção por HPV não demonstrou relação com nenhum dos fatores envolvidos na avaliação anátomo-patológica; dessa forma, não pode ser considerada como um fator prognóstico isolado conforme proposto por MONK et al. (1995) e KNOPP et al. (2006). Outros trabalhos, ao contrário dos supracitados,

corroboraram com os dados gerados nesse estudo. Nesses trabalhos não foi possível encontrar nenhum fator prognóstico relevante envolvido com a infecção por HPV (BLOSS et al. 1991; KAGIE et al. 1997; PINTO et al. 2004). A relação prognóstica discrepante encontrada pode ser associada à metodologia utilizada por cada autor para definir a infecção pelo Papilomavírus humano e o método de análise.

Estudos tem demonstrado a relação da disseminação peri-operatoria de células neoplásicas com a densidade microvascular intratumoral, desta forma, a formação de novos vasos sanguíneos é um dos mecanismos que permite o crescimento tumoral, disseminação hematogênica e ocorrência de metástases. Por outro lado os mecanismos envolvidos na disseminação neoplásica via sistema linfático são poucos conhecidos. O marcador de linfático D2-40 não mostrou nenhuma significância com a densidade microvascular, área media e mediana vascular nos paralelos analisados. BAI et al. (2013) e DEBINSKI et al. (2013) por meio de estudos sobre a linfanogênese em carcinoma de cabeça e pescoço não notaram significância estatística entre a área vascular linfática quando comparada com fatores como idade, sexo, local do tumor e diferenciação, mas quando foi analisado estadiamento TNM houve significância estatística, indicando os pacientes em três grupos como T1+T2/T3, N0 e N1, os dados foram analisados por meio do teste X^2 .

WANG et al. (2004), OMORI et al. (2007) e HAN et al. (2011) comparam a expressão do D2-40 com a expressão de p16 (usado como guia para a presença de HPV) em carcinomas uterino. Houve aumento da

expressão de p16 em pacientes classificados como alto grau porém não foi encontrada relação entre p16 e o aumento da expressão de D2-40 (verificado em pacientes com grau mais inferior), uma vez que foi notado efeito contrário em alguns estudos, onde houvesse aumento do p16 haveria pouca expressão de D2-40. Os autores descartaram a hipótese de que o aumento da expressão de p16, subsequente ao HPV induziria a potencialização do D2-40 e como consequência o aumento da vascularização linfática.

Nesta dissertação o uso do D2-40 foi como forma comparativa para verificar se a linfanogênese está associada de forma direta com a angiogênese em carcinoma peniano em pacientes HPV positivo e HPV negativo. Não houve relação direta, talvez seja pela metodologia utilizada, pois é uma metodologia inovadora, inclusive com o teste Mann-Whitney, outra possibilidade seria a casuística, no qual poderia por exemplo fazer estudo com alto risco, baixo risco separadamente, para buscar um possível relação. Sabe-se que atualmente os pacientes HPV alto risco tem maior potencial de causar câncer genital, porém na literatura não há muitos estudos sobre a linfanogênese em órgãos genitais induzido por HPV, seja alto ou baixo risco. Não foi dado muito foco para a linfanogênese, pois diverge do objetivo proposto.

Um dos principais anticorpos utilizados foi o CD105, caracterizado como glicoproteína de membrana endotelial tem a capacidade de marcar vasos (capilares, arteríolas e vênulas) recém formados. Como o estudo

visualiza a angiogênese em carcinoma de pênis, este marcador torna-se fundamental para a análise da neoformação vascular.

Quando analisado a relação angiogênese (pacientes com tumor HPV alto risco positivo e pacientes com tumor HPV baixo risco ou negativo) *versus* idade, não houve relevância estatística, este paralelo não demonstrou ter relação com a nova formação vascular em todos os marcadores utilizados, tanto em marcadores de expressão celular de fatores angiogênicos quanto marcadores endoteliais e o D2-40 endotelial linfático. Autores como RODRIGUES et al. (2006), DAMICO (2007) e DORRELL et al. (2007) relatam por meio de estudos neovasculares de retina que o fator idade não é potencial importante para a angiogênese, isso quando comparado amostras com tumor e sem tumor. Não há diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Notou-se nestes estudos é a diminuição da vascularização da retina com o passar dos anos, então sendo necessário um tratamento angiogênico para a revascularização normal da estrutura.

O câncer em geral é amplamente discutido, tanto molecularmente quanto clínico-patológico e um dos grandes focos atualmente tem sido o poder que determinado tumor tem em relação ao potencial metastático, na casuística deste trabalho não constam pacientes que metastatizaram, embora haja um acervo grande de carcinoma de pênis no A.C.Camargo Cancer Center. Os critérios de inclusão foram refinados para procurar um padrão na coleta das amostras. Este processo de escolha priorizou pacientes HPV positivo e HPV negativo e não características clínicas ou

patológicas e conseqüentemente não houve inclusão de pacientes com metástase.

Marcadores como CD34, CD31 e VEGF não mostraram ter uma relação totalmente direta entre HPV e angiogênese em carcinoma de pênis, provavelmente pela propriedade do órgão em questão, pois o pênis é bastante vascularizado. Faz parte da biologia deste órgão ser extremamente irrigado e estes marcadores são de vasos já formados, o que gera a seguinte questão: será que tais vasos marcados são próprios do pênis, foram causados pelo processo tumoral ou pelo processo tumoral em associação com o HPV? O grande revelador destas perguntas está na associação do CD105, este sim é um marcador mais específico para a pergunta do projeto, uma vez que o padrão de marcação é a neovascularização, foi por meio deste marcador que foi possível verificar a nova vascularização que o HPV alto risco provoca nos pacientes com câncer de pênis. Só a associação entre CD34, CD31 e VEGF não seria possível para carcinoma de pênis, devido fatores descritos anteriormente.

O desenvolvimento deste estudo teve como barreira algumas limitações, seja pelo próprio tipo tumoral, raro e pouco estudado, contendo assim uma quantidade limitada de amostras, não possibilitando estudos de larga escala seguindo os critérios de inclusão. O atual projeto teve fatores diferenciados, como o método no qual foram analisados o resultados, baseando-se no teste Mann-Whitney no qual utiliza valores de mediana para uma possível significância estatística e a maioria dos trabalhos encontrados

utilizaram testes no qual valores de média são utilizados, não permitindo a comparação direta entre os resultados obtidos.

Outro importante aspecto diferencial deste trabalho foi o método da análise de lâminas, este procedimento foi totalmente automatizado pelo escaneador de lâminas ScanScope® XT (Aperio Digital Pathology System – Aperio, Vista, CA, USA). Esta tecnologia não é difundida nos laboratórios de patologia, devido aos custos. Este aparelho foi utilizado no trabalho para visualizar e quantificar a vascularização tecidual (CD31, CD34, CD105 e D2-40) e também para demonstrar a intensidade de marcação dos anticorpos VEGF, VEGFR1 e VEGFR2. A análise do p16 foi unicamente visual, seguindo o critério proposto por Chaux e Cubilla (2012).

Este trabalho foi desenvolvido com um número significativo de marcadores angiogênicos e comparando-os com o processo de vascularização em paralelo ao HPV. Valores significativos foram encontrados e alguns corroboraram e outros discordam com a literatura. Estudo de caráter inovador com intuito de proporcionar um melhor entendimento sobre câncer de pênis, sendo possível revisar condutas de pesquisa sobre o foco. Atualmente não há trabalhos semelhantes disponíveis, sendo este trabalho de potencial inédito e investigativo. Será necessário estudos futuros e semelhantes para confirmarem os achados contidos nessa dissertação.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que apenas a neoangiogênese, marcada pelo CD105, esteve mais pronunciada em casos de câncer de pênis associados ao HPV de alto risco. Isto aponta para um mecanismo adjuvante da neoangiogênese, promovida ou facilitada por esse vírus. Demais marcadores vasculares como CD31, CD34 e D2-40 não demonstraram relação com a infecção pelo HPV.

A análise da expressão protéica nas células neoplásicas dos marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 não demonstrou relação com o HPV. Porém houve associação de maior expressão de VEGF e VEGFR1 com a presença de linfonodos comprometidos pela neoplasia, ou seja, com um indicador de pior prognóstico. Entretanto, este achado necessita de estudos mais aprofundados, pois a expressão maior de VEGFR1 esteve também associada à ausência de invasão perineural e a maior expressão de VEGFR2 esteve associada à ausência de invasão perineural, vascular e grau histológico mais diferenciado, o que contrasta com o dado do status linfonodal.

A utilização da imunomarcagem da proteína p16 como marcador da infecção pelo HPV de alto risco no CaPe não foi apoiada pelos nossos dados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Najar A, Al-Sanabani S, Korda JB, et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. **Urol Oncol** 2012; 30-325:9.

Arroyo LS, Smelov V, Bzhalava D, Eklund C, Hultin E, Dillner J. Next generation sequencing for human papillomavirus genotyping. **J Clin Virol** 2013; 58:437-42.

Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell sub populations in head and neck cancers. **Clin Cancer Res** 2006; 12:465-72.

Bai B, Ma W, Wang K, et al. Detection of D2-40 monoclonal antibody-labeled lymphatic vessel invasion in esophageal squamous cell carcinoma and its clinicopathologic significance. **Cancer Biol Med** 2013; 10:81-5.

Baigent SJ, Kgosana LB, Gamawa AA, Smith LP, Read AF, Nair VK. Relationship between levels of very virulent MDV in poultry dust and in feather tips from vaccinated chickens. **Avian Dis** 2013; 57(Suppl):440-7.

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

Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Connelly RR, Moul JW. CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. **J Urol** 1998; 160:459-65.

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

Bloss JD, Liao SY, Wilczynski SP, et al. Clinical and histologic features of vulvar carcinomas analyzed for human papillomavirus status: evidence that squamous cell carcinoma of the vulva has more than one etiology. **Hum Pathol** 1991; 22:711-8.

Branca M, Giorgi C, Santini D, et al. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. **J Clin Pathol** 2006; 59:40-7.

Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, Johnston JM, Mann JL, McAsey ME. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. **Obstet Gynecol** 2000; 96:224-8.

Calmon MF, Tasso Mota M, Vassallo J, Rahal P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. **ScientificWorldJournal** 2011; 11:269-82.

Calmon MF, Mota MT, Babeto E, et al. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. **PLoS One** 2013; 8:e53260.

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 Immunol** 1998; 16:256-62.

Carlson BC, Hofer MD, Ballek N, Yang XJ, Meeks JJ, Gonzalez CM. Protein markers of malignant potential in penile and vulvar lichen sclerosis. **J Urol** 2013; 190:399-406.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature** 2005; 438:932-6.

Chaux A, Cubilla A. Advances in the pathology of penile carcinomas. **Human Pathol** 2012; 43:771-89.

Cubilla AL, Dillner J, Schellhammer PF, et al. Malignant epithelial tumors of the penis. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhann IA, editors. **Pathology and genetics: tumors of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC; 2004. p.281-90. (World Health Organization classification of the tumors).

Cubilla AL, Ayala G, Lopes A, et al. Perineural invasion (PNI) predicts mortality in penile squamous cell carcinoma. A long-term outcome study comparing clinico-pathologic features. **Lab Invest** 2007; 87:142A.

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

Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, et al. Value of p16^{INK4a} in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: a report of 202 cases. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:253-61.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat Med** 2004; 10:942-9.

Dales JP, Garcia S, Bonnier P, et al. CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. **Am J Clin Pathol** 2003; 119:374-80.

Damico FM. Angiogenesis and retinal disease. **Arq Bras Oftalmol** 2007; 70:547-53.

Debinski P, Dembowski J, Kowal P, et al. The clinical significance of lymphangiogenesis in renal cell carcinoma. **Med Sci Monit** 2013; 19:606-11.

Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **Histopathology** 2013; 62:161-75.

Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A. Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal cell carcinoma. **Br J Urol** 1997; 80:401-4.

Dellinger MT, Meadows SM, Wynne K, Cleaver O, Brekken RA. Vascular endothelial growth factor receptor-2 promotes the development of the lymphatic vasculature. **PLoS One** 2013; 8:e74686.

Dinney CP, Babkowski RC, Antelo M, et al. Relationship among cystectomy, microvessel density and prognosis in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. **J Urol** 1998; 160:1285-90.

Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. **Surv Ophthalmol** 2007; 52(Suppl 1):S3-19.

Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. **J Tromb Haemost** 2005; 3:1835-42.

Eifler LS. **Estadiamento e sobrevida no cancer gastric: papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A)**. Porto Alegre; 2012. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. **Am J Clin Pathol** 2007; 127:572-9.

Espinoza I, Pochampally R, Xing F, Watabe K, Miele L. Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. **Oncotargets Ther** 2013; 6:1249-59.

Fang L, Choi SH, Baek JS, et al. Control of angiogenesis by AIBP-mediated cholesterol efflux. **Nature** 2013; 498:118-22.

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

Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, et al. Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the 16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. **J Pathol** 2003; 201:109-18.

Fei J, Hong A, Dobbins TA, Jones D, Lee CS, Loo C, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinomas of the tonsil in relation to human papillomavirus status and epidermal growth factor receptor. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:2908-17.

Florence ME, Massuda JY, Bröcker EB, Metze K, Cintra ML, Souza EM. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers. **Clinics** 2011; 66:465-8.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. **J Biol Chem** 1992; 267:10931-34.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med** 1971; 285:1182-6.

Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. **Oncogene** 2003; 22:6557-63.

Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. **Cancer** 1999; 85:1323-30.

Funaki H, Nishimura G, Harada S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. **Oncology** 2003; 64:416-22.

Gonzaga-Silva LF, Lima GR, Tavares JM, et al. Locally advanced penile carcinoma: classic emasculation or testis-sparing surgery? **Int Braz J Urol** 2012; 38:750-9.

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, Rocha RM, Zequi SC, Cunha IW, Soares FA. Penile cancer: epidemiology and treatment. **Curr Oncol Rep** 2011; 13:231-9.

Hall MC, Troncoso P, Pollack A, et al. Significance of tumor angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma treated with external beam radiotherapy. **Urology** 1994; 44:869-75.

Han H, Yang Y, Lu Z, He Q, Lin Z. Decreased D2-40 and increased p16INK4A immunoreactivities correlate with higher grade of cervical intraepithelial neoplasia. **Diagn Pathol** 2011; 6:59.

Hawke CK, Delahunt B, Davidson PJ. Microvessel density as a prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder. **Br J Urol** 1998; 81:585-90.

He L, Zhang E, Shi J, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits human papillomavirus (HPV)-16 oncoprotein-induced angiogenesis in non-small cell lung cancer cells by targeting HIF-1a. **Cancer Chemother Pharmacol** 2013; 71:713-25.

Jaeger TM, Weidner N, Chew K, et al. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. **J Urol** 1995; 154:69-71.

Kagie MJ, Kenter GG, Tollenaar RA, Hermans J, Trimpos JB, Fleuren GJ. p53 protein overexpression is common and independent of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva. **Cancer** 1997; 80:1228-33.

Kalitin NN, Kostyukova MN, Kakpakova ES, Tupitsyn NN, Karamysheva AF. Expression of vascular endothelial growth factor receptors VEGFR1 in cultured multiple myeloma cells: correlation with immunophenotype and drug resistance. **Bull Exp Biol Med** 2012; 153:882-5.

Kazama S, Kitayama J, Watanabe T, Nagawa H. Expression pattern of vascular endothelial growth factor in human colorectal normal mucosa and neoplastic mucosa. **Hepatogastroenterology** 2004; 51:391-5.

Kim SO, Lee HS, Ahn K, Park K. COMP-angiopoietin-1 promotes cavernous angiogenesis in a type 2 diabetic rat model. **J Korean Med Sci** 2013; 28:725-30.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16^{INK4A} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int J Cancer** 2001; 92:276-84.

Knopp S, Nesland JM, Tropé CR, Holm R. p14ARF, a prognostic predictor in HPV-negative vulvar carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2006; 126:266-76.

Kohler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz EW, Bittinger A. Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas. **Br J Urol** 1996; 77:650-4.

Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Melo Maia B, et al. Cell cycle suppressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma. **Tumour Biol** 2013 Jul 6. [Epub ahead of print].

Livezeanu C, Crăițoiu MM, Mănescu R, Mocanu C, Crăițoiu S. Angiogenesis in the pathogenesis of pterygium. **Rom J Morphol Embryol** 2011; 52:837-44.

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** 1996a; 156:1637-42.

Lopes A, Rossi BM, Fonseca FP, Morini S. Unreliability of modified inguinal lymphadenectomy for clinical staging of penile carcinoma. **Cancer** 1996b; 77:2099-102.

Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. **Cancer Cell** 2012; 22:21-35.

Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. **Am J Pathol** 2006; 168:639-48.

Martins ACP, Britto S, Takata C, et al. VEGF immunoexpression in penile carcinoma. **Acta Cir Bras** 2002; 17(Suppl. 3):52-4.

Martone T, Rosso P, Albera R, et al. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patients outcome. **Oral Oncol** 2005; 41:147-55.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012: incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Miyata Y, Sagara Y, Watanabe SI, et al. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34. **Virchows Arch** 2013 Aug 25. [Epub ahead of print].

Monk BJ, Burger RA, Lin F, Parham G, Vasilev SA, Wilczynski SP. Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. **Obstet Gynecol** 1995; 85(Pt 1):709-15.

Monteiro-Amado F, Castro-Silva II, Lima CJ, Soares FA, Kowalski LP, Granjeiro JM. Immunohistochemical evaluation of MMP-2, MMP-9 and CD31/microvascular density in squamous cell carcinomas of the floor of the mouth. **Braz Dent J** 2013; 24:3-9.

Mutschall L, França PC, Ferreira LE, Fronza Jr. H, Blasios R, Pinho M. Analysis of relationship between vegf protein expression and colorectal cancer staging. **Rev Bras Coloproct** 2009; 29:15-22.

Nativ O, Sabo E, Reiss A, Wald M, Madjar S, Moskovitz B. et al. Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma. **Urology** 1998; 51:693-6.

Novara G, Galfano A, de Marco V, Artibani W, Ficarra V. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **Nat Clin Pract Urol** 2007; 4:140-6.

Oliveira-Costa JP, Silveira GG, Soave DF, et al. Human papillomavirus infection and penile cancer: past, present and future. In: Broek DV, editor. **Human papillomavirus and related diseases from bench to bedside a diagnostic and preventive perspective**. Croatia: Intech; 2011. p.221-40.

Omori M, Hashi A, Nakazawa K, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoreexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. **Am J Clin Pathol** 2007; 128:208-17.

Ono Y, Ozawa M, Tamura Y, et al. Tumor-associated tissue eosinophilia of penile cancer. **Int J Urol** 2002; 9:82-7.

Ornellas AA, Nóbrega BL, Wei Kin Chin E, Wisnescky A, da Silva PC, de Santos Schwindt AB. Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. **J Urol** 2008; 180:1354-9.

Paula AAP, Netto JCA, Cruz AD, Júnior RF. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. **Rev Bras Cancerol** 2005; 51:243-52.

Pinto AP, Schlecht NF, Pintos J, et al. Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. **Gynecol Oncol** 2004; 92:856-65.

Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H, et al. EAU penile cancer guidelines 2009. **Eur Urol** 2010; 57:1002-12.

Ranieri G, Gasparini G. Surrogate markers of angiogenesis and metastasis. **Methods Mol Med** 2001; 57:99-113.

Rietbergen MM, Brakenhoff RH, Bloemena E, et al. Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. **Ann Oncol** 2013; 24:2740-5.

Robinson M, Suh YE, Paleri V, et al. Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population. **Infect Agent Cancer** 2013; 8:30.

Rodrigues EB, Rossi EE, Grumann Junior A, Meyer CH, Ho AC. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. **Arq Bras Oftalmol** 2006; 69:756-65.

Rubin MA, Buyyounouski M, Bagiella E, et al. Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage, and clinical outcome. **Urology** 1999; 53:542-7.

Ryu J, Suh J. Therapeutic angiogenesis as a potential future treatment strategy for erectile dysfunction. **World J Mens Health** 2012; 30:93-8.

Samples J, Willis M, Klauber-Demore N. Targeting angiogenesis and the tumor microenvironment. **Surg Oncol Clin N Am** 2013; 22:629-39.

Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, et al. DNA Extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **J Histochem Cytochem** 2002; 50:1005-11.

Solsona E, Iborra I, Rubio J, Casanova JL, Ricós JV, Calabuig C. Prospective validation of the association of local tumor stage and grade as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal lymph nodes. **J Urol** 2001; 165:1506-9.

Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in site-specific HPV positive and HPV negative head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Clin Oncol** 2013; 2:51-61.

Valiatti FB, Crispim D, Benfica C, Valiatti BB, Kramer CK, Canani LH. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2011; 55:106-13.

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

Viacava P, Gasperi M, Acerbi G, et al. Microvascular density and vascular endothelial growth factor expression in normal pituitary tissue and pituitary adenomas. **J Endocrinol Invest** 2003; 26:23-8.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström MS, Wallin KL: Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:2407-14.

Yoshino S, Kato M, Okada K. Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma. **Int J Urol** 1998; 5:119-23.

Zätterström UK, Brun E, Willén R, Kjellén E, Wennerberg J. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck** 1995; 17:312-8.

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

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:342-50.

**Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do
A.C.Camargo Cancer Center**



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 11 de Outubro de 2011,

Ao
Dr. José Vassallo

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1369/10-B
"O carcinoma de pênis: estudo de um problema brasileiro abordando da morfologia aos mecanismos moleculares".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 04/10/2011, **tomaram conhecimento e aprovaram** a solicitação de dispensa da apreciação do estudo intitulado "Estudo da angiogênese no Carcinoma Peniano", em razão deste estudo estar inserido em projeto supracitado, previamente aprovado por este comitê.

Atenciosamente,


Dr. Alexandre Sa de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa