

PUCRS

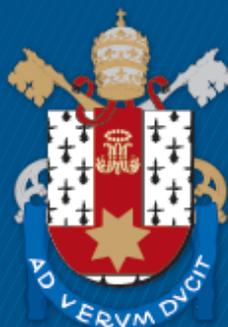
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DOUTORADO EM CLÍNICA CIRÚRGICA

MATEUS WEBBER DE BACCO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES  
TECIDUAIS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PÊNIS**

Porto Alegre  
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA**

**MATEUS WEBBER DE BACCO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE  
BIOMARCADORES TECIDUAIS NO CARCINOMA DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS DE PÊNIS**

**PORTO ALEGRE**

**2019**

**MATEUS WEBBER DE BACCO**

**“Análise da expressão imuno-histoquímica de biomarcadores teciduais no carcinoma de células escamosas de pênis”**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como exame para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde - Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.**

**Orientador: Prof. Dr. André Poisl Fay**

**Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal**

**PORTO ALEGRE**

**2019**

## Ficha Catalográfica

D278a De Bacco, Mateus Webber

Análise da Expressão Imuno-histoquímica de Biomarcadores Teciduais no Carcinoma de Células Escamosas de Pênis / Mateus Webber De Bacco . – 2019.

81.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. André Poisl Fay.

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal.

1. Câncer de pênis. 2. Biomarcadores. 3. PD-L1. 4. Survivina. I. Fay, André Poisl. II. Carvalhal, Gustavo Franco. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. André Pois Fay, meu orientador, pelo exemplo de profissional e de competência, pela extrema dedicação à ciência e pesquisa em toda sua trajetória. Por ter aceitado a orientação deste trabalho mesmo após já iniciado e por ter me motivado a ampliá-lo e estimular a acreditar que é possível realizar bons trabalhos mesmo com todas as adversidades inerentes ao mundo da pesquisa.

Ao Dr. Gustavo Franco Carvalhal, meu co-orientador, pelo exemplo profissional, dedicação pela ciência e competência. Acreditou no meu potencial desde o período da residência médica e me estimulou na caminhada da pós-graduação. Esteve sempre presente em todos momentos e trouxe a tranquilidade necessária para concluir o doutoramento.

À Dra. Josenel Maria Barcelos Marçal, pela fundamental ajuda e comprometimento, por todo conhecimento que foi indispensável na análise anatomo-patológica sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

À técnica em patologia Juliana dos Santos Silva, pela ajuda na seleção dos pacientes, na organização e na construção do banco de dados.

Aos meus pais, que me proporcionaram todo o suporte e as condições necessárias para minha formação e por sempre incentivarem e apoiarem meu crescimento pessoal e profissional.

À minha esposa Marcela Krug Seabra por todo seu amor, companheirismo, incentivo e compreensão durante toda esta caminhada; por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e, por tantos questionamentos pessoais, sempre me apoiando, estimulando e me dando a segurança necessária e a tranquilidade para seguir em frente.

Ao meu irmão, Felipe Webber De Bacco, por ter sido minha referência nos anos de faculdade e de residência médica, pelas experiências divididas nesta época e por ter sempre desafiado meu crescimento pessoal e intelectual.

Aos meus sogros, por toda ajuda pessoal e profissional, pelos ensinamentos e por todo apoio e confiança no meu crescimento profissional.

À PUCRS e Hospital São Lucas, pela minha formação profissional urológica e por propiciar minha pós graduação neste doutorado.

Aos colegas do serviço de Urologia da PUCRS pela parceria e auxílio na coleta e seleção dos pacientes ao longo destes quatro anos, em especial ao Dr. Carlos Eduardo Schio Fay, pela gentileza de ceder o banco de dados de estudo previamente realizado na instituição.

À CAPES por financiar esta pesquisa e incentivar a ciência neste país.

## RESUMO

O câncer de pênis é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, entretanto, tem sua incidência elevada em países subdesenvolvidos, apresentando um prognóstico reservado na maioria dos casos. O carcinoma de células escamosas de pênis (CCEP) é o tipo histológico mais comum, sendo responsável por cerca de 95% dos casos. Diversos biomarcadores tem sido estudados recentemente na expectativa de compreender melhor as alterações tumorais nos tecidos. Entretanto, há poucos estudos avaliando a expressão de biomarcadores no CCEP e sua correlação com fatores prognósticos. Devido à escassez de dados, as opções de tratamento são limitadas. O presente estudo pretende avaliar a expressão imuno-histoquímica (IHQ) dos biomarcadores Survivina, Ki67, p16 e PD-L1 na neoplasia de pênis e verificar a associação de sua expressão com fatores prognósticos estabelecidos e com a sobrevida em 5 anos.

Foram incluídos 40 pacientes submetidos a cirurgia de penectomia parcial ou total entre 1998 e 2016 no Serviço de Urologia do Hospital São Lucas da PUC/RS com diagnóstico de CCEP. Cinco pacientes foram excluídos do estudo por falta de dados. A survivina esteve expressa em nove pacientes (25,7%). A mortalidade observada no grupo survivina+ foi significativamente superior (HR de 3,73 e IC de 95% variando de 1,25 a 11,12 para  $p=0,018$ ). O PD-L1 esteve expresso em 18 pacientes (51,4%), predominantemente em lesões grau II e grau III (61,1% e 16,6%) Nos pacientes com acometimento linfonodal, 69,2% eram PD-L1+. Os pacientes PD-L1+ apresentaram tumores de maior tamanho (4,25cm X 2,6cm;  $p=0,027$ ), de maior celularidade, evidenciado pela correlação com Ki67>10% em 80% dos pacientes ( $p=0,006$ ). Houve correlação estatística do PD-L1+ com a expressão de p16 ( $p=0,002$ ).

A expressão da survivina parece estar associada à maior agressividade e maior mortalidade no CCEP. A expressão de PD-L1 pode estar associada à expressão de p16, à tumores maiores e com pior desfecho clínico.

## ABSTRACT

Penile cancer is a rare urological malignancy in developed countries; however, it has a high incidence in developing countries. Penile squamous cell carcinoma (PSCC) is the most common histological type. Several biomarkers have recently been studied trying to better understand tumor changes in tissues. However, there are few studies evaluating the expression of biomarkers in penile cancer and its correlations with prognostic factors. Due to the lack of data, treatment options are limited. Objective: To evaluate the immunohistochemical expression of survivin, Ki67, p16 and PD-L1 in PSCC and to verify its association with established prognostic factors and 5-year survival.

Forty patients with PSCC and submitted to partial or total penectomy between 1998 and 2016 at the Urology Department of the São Lucas Hospital of PUC/RS were included. Five out of 40 were excluded due to lack of data. Survivin was expressed in nine patients (25.7%). Mortality in the survivin+ group was significantly higher (HR of 3.73 and 95% CI ranging from 1.25 to 11.12;  $p=0.018$ ). PD-L1 was expressed in 18 patients (51.4%), predominantly in grade II and grade III lesions (61.1% and 16.6%). In patients with lymph node involvement, 69.2% were PD-L1+. PD-L1+ patients presented larger tumors (4.25cm X 2.6cm;  $p=0.027$ ), with higher cellularity, evidenced by correlation with Ki67>10% in 80% of patients ( $p=0.006$ ). There was a statistical correlation between PD-L1+ and p16 expression ( $p=0.002$ ). Survivin expression seems to be associated with tumor aggressiveness and higher mortality rate in CCEP. PD-L1 expression may be associated with p16 expression, with larger tumors and with worse clinical outcome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vias da apoptose, extraído de Elamores, 2007 .....	26
<b>Figura 2:</b> Coloração de hematoxilina-eosina no CCEP Grau 2; aumento de 200X .....	35
<b>Figura 3:</b> Coloração de hematoxilina-eosina no CCEP Grau 3; aumento de 200X.....	35
<b>Figura 4:</b> Imuno-histoquímica para survivina, marcação citoplasmática; aumento de 400X .....	36
<b>Figura 5:</b> Imuno-histoquímica para survivina, marcação de membrana; aumento de 400X .....	36
<b>Figura 6:</b> Imuno-histoquímica para Ki67, marcação nuclear ; aumento de 400X .....	36
<b>Figura 7:</b> Imuno-histoquímica para p16, coloração nuclear ; aumento de 400X .....	37
<b>Figura 8:</b> Imuno-histoquímica para PD-L1, coloração de membranas; aumento 400X .....	37
<b>Figura 9:</b> Imuno-histoquímica para PD-L1, coloração citoplasmática; aumento 200X .....	37
<b>Figura 10.</b> Expressão da survivina X sobrevida em 60 meses .....	42
<b>Figura 11.</b> Expressão do Ki67 X sobrevida em 60 meses .....	44
<b>Figura 12.</b> Expressão do p16 X sobrevida em 60 meses .....	46
<b>Figura 13.</b> Expressão do PD-L1 X sobrevida em 60 meses .....	48
<b>Figura 14.</b> Associação dos marcadores tumorais com a ocorrência de óbito em pacientes com CCEP .....	48

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Estadiamento TNM do câncer de pênis - American Joint Committee on Cancer.....	19
<b>Quadro 2.</b> Tabela 2. Estadiamento do câncer de pênis segundo o American Joint Committee on Cancer .....	20
<b>Quadro 3.</b> Expressão da survivina em diferentes neoplasias .....	27
<b>Tabela 1.</b> Características da população em estudo .....	40
<b>Tabela 2.</b> Análise da expressão imuno-histoquímica da survivina .....	41
<b>Tabela 3.</b> Análise da expressão imuno-histoquímica do Ki67 .....	43
<b>Tabela 4.</b> Análise da expressão imuno-histoquímica do p16 .....	45
<b>Tabela 5.</b> Análise da expressão imuno-histoquímica do PD-L1 .....	47

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SEER	Do Inglês, Surveillance Epidemiology and End Results
HPV	Do Inglês, Human papilloma virus (papiloma vírus humano)
DNA	Do Inglês, deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
Tis	Do Inglês, carcinoma <i>in situ</i> (carcinoma in situ do pênis)
CCEP	Carcinoma de Células Escamosas do Pênis
AJCC	Do Inglês, American Joint Committee on Cancer Union for International Cancer Control
UICC	Do Inglês, Union for International Cancer Control
Gy	Do Inglês, Gray (unidade de dose de radiação absorvida)
TPF	Quimioterapia baseada em cisplatina, 5-fluoracil e paclitaxel
IHQ	Imuno-histoquímica
PCR	Do Inglês, Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
RTPCR	Do Inglês, Real Time Polymerase Chain Reaction
PUC/RS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
HSL	Hospital São Lucas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>Câncer de Pênis .....</b>	<b>11</b>
Classificação Histológica .....	14
<b>Tratamento .....</b>	<b>21</b>
Cirurgia:.....	21
Radioterapia: .....	22
Doença Linfonodal: .....	23
Quimioterapia:.....	24
<b>Survivina e Apoptose Celular.....</b>	<b>25</b>
<b>P16 .....</b>	<b>28</b>
<b>Ki-67 .....</b>	<b>29</b>
<b>PD-L1 .....</b>	<b>29</b>
<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS DO ESTUDO .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
Delineamento: .....	32
População em estudo.....	32
<b>Avaliação imuno-histoquímica .....</b>	<b>32</b>
Análise de Imunocoloração.....	33
<b>ÉTICA.....</b>	<b>34</b>
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>38</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
Caracterização da amostra .....	39
Análise imuno-histoquímica .....	40
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>LIMITAÇÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS:.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>
Termo de compromisso para utilização de dados: .....	62
Aprovação CEP/SIPESQ .....	63
Artigo Científico .....	64

# INTRODUÇÃO

## Câncer de Pênis

O câncer de pênis é uma neoplasia urológica rara em países desenvolvidos; entretanto, tem sua incidência elevada em países subdesenvolvidos. (Backes *et al.*, 2009). Representa cerca de 0,4% a 0,6% das neoplasias que acometem os homens nos Estados Unidos e na Europa, podendo chegar a cerca de 10% em países Asiáticos, Africanos e Sul-americanos. (Chaux *et al.*, 2013; Hakenberg *et al.*, 2015). No Brasil, esse tipo de tumor chega a 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, sendo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste, que apresentam incidência em torno de cinco vezes maior que nas regiões Sul e Sudeste. (Gonzaga-Silva *et al.*, 2007). Sua prevalência é maior na sexta década de vida, com sobrevida global e em cinco anos de cerca de 61%. (Pham *et al.*, 2017).

De acordo com dados do Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER), o câncer de pênis não apresenta diferença de incidência entre as raças. Porém, a raça negra está relacionada com pior desfecho clínico, tendo mortalidade 2,2 vezes maior quando comparados à branca. (Rippentrop *et al.*, 2004).

O câncer de pênis acomete preferencialmente homens idosos com higiene precária. A circuncisão no período neonatal é medida profilática que reduz significativamente a probabilidade de neoplasia de pênis, uma vez que retira o prepúcio, região preferencial de desenvolvimento do carcinoma. (Schoen *et al.*, 2000). A reação inflamatória crônica causada pela presença de esmegma, subproduto da ação bacteriana na descamação celular, é tida como possível agente causal do câncer de pênis uma vez que o efeito irritativo crônico junto ao prepúcio e a glândula pode levar à fimose. (Schoen *et al.*, 2000).

O papiloma vírus humano (HPV) pode estar associado ao desenvolvimento tanto de lesões pré-malignas como do carcinoma *in situ* no pênis. Sua presença nos carcinomas *in situ* foi primeiramente identificada por Pfister e Haneke em 1984. (Pfister e Haneke, 1984). Caracteriza-se pela presença de coilócitos, célula típica da infecção por HPV. Tal célula apresenta-se como espaços perinucleares vazios e núcleo celular atípico e aumentado. (Schneider, 1989). Através de técnicas de hibridização de DNA, mais de 100 subtipos já foram identificados. (Ventimiglia *et al.*, 2016).

Os subtipos 6 e 11 estão mais frequentemente relacionados a verrugas genitais com baixa displasia, mas também podem ser identificados em carcinomas verrucosos não

metastáticos. Já os subtipos 16, 18, 31 e 33 estão associados à doença *in situ* e invasiva sendo o 16 o subtipo mais prevalente e já tendo sido detectado em metástases de carcinoma de pênis. (Mentrikoski *et al.*, 2014).

Entretanto, embora a infecção por HPV seja fator importante na etiologia do câncer de pênis, sua presença pode ser bastante variável – entre 30% a 80% (Daling *et al.*, 2005) – sugerindo a existência de outros fatores no desenvolvimento da doença e de seus subtipos histológicos, tais como exposição ao tabaco, história de trauma peniano e presença de líquen escleroso.

As lesões pré-malignas também podem ser subdivididas de acordo com a presença do HPV. Dentre as lesões não relacionadas ao HPV podemos citar o corno cutâneo, balanite xerótica obliterante, leucoplasia e balanite ceratótica. Já dentre as lesões associadas ao vírus encontram-se o condiloma acuminado, doença de Bowen e Sarcoma de Kaposi.

O carcinoma *in situ* do pênis (Tis) é também conhecido como *Eritroplasia de Queyrat* quando acomete a glândula peniana ou prepúcio. Inicialmente descrita em 1911 por Queyrat, é uma lesão avermelhada, aveludada e bem delimitada que acomete mais frequentemente a glândula peniana. Em sua evolução pode apresentar ulcerações, secreção e dor. Tem potencial de progressão para carcinoma de células escamosas de pênis em 10% a 33% dos casos. (Bleeker *et al.*, 2009).

Em 1912, Bowen descreveu uma lesão intraepitelial da pele com potencial de progressão para doença maligna, sendo histologicamente similar à Eritroplasia de Queyrat. Ambas são caracterizadas por alterações na mucosa, que passa a apresentar células hiperplásicas atípicas e múltiplos núcleos hipercromáticos em diversas fases de mitose. O revestimento epitelial estende-se até a submucosa e encontra-se alargado e bulboso. A submucosa apresenta proliferação e ectasia capilar com infiltrado inflamatório no seu permeio. Clinicamente, apresenta-se como placas bem delimitadas com eritema escamoso acometendo a haste peniana. Caso não tratada, pode evoluir para carcinoma invasivo em até 5% dos casos. (Buechner, 2002).

A doença de *Buschke-Löwenstein* ou carcinoma verrucoso ou condiloma acuminado gigante foi primeiramente descrita por Buschke e Löwenstein em 1925. É uma lesão verrucosa do pênis muitas vezes confundida com o carcinoma de células escamosas de baixo grau. Apresenta crescimento local podendo invadir os tecidos adjacentes sem, no entanto, demonstrar transformação maligna ou disseminação de metástases. Estas lesões podem estar relacionadas ao HPV. A disseminação linfonodal é rara neste tipo de lesão e quando presente

possivelmente representa degeneração maligna. Biópsia excisional é o tratamento padrão e a recorrência é comum, requerendo seguimento contínuo.

O câncer invasivo de pênis pode desenvolver-se em qualquer região do pênis, mas mais frequentemente inicia na glândula (em 48% dos casos), no prepúcio (em 21%), na glândula e prepúcio (em 9%), no sulco coronal (em 6%) e na haste peniana (em torno de 2% dos casos). Apresenta-se como uma lesão pequena com crescimento gradual podendo progredir para bolsa escrotal e testículos. A lesão inicial pode ser do tipo papilar e exofítica ou plana e ulcerativa. Sabe-se que o crescimento de tais lesões é similar. Entretanto, as lesões do tipo ulcerativo apresentam maior risco de acometimento linfonodal e pior prognóstico. (Ornellas *et al.*, 1994).

A fáscia profunda do pênis, também conhecida como fáscia de Buck, representa uma barreira natural para a extensão local da lesão. A invasão da fáscia de Buck e posteriormente da túnica albugínea permite contato com corpo cavernoso e esponjoso, estabelecendo potencial para disseminação vascular.

A disseminação linfática da neoplasia de pênis ocorre inicialmente para os linfonodos da região femoral e ilíaca. Sabe-se que a rede linfática do prepúcio e da pele da haste peniana drenam para os linfonodos inguinais superficiais (externos à fáscia lata). A rede linfática da glândula une-se à rede linfática dos corpos cavernosos que também drenam para os linfonodos inguinais superficiais. Já os linfonodos inguinais superficiais drenam para os linfonodos inguinais profundos, que são os que encontram-se abaixo da fáscia lata. A drenagem linfática dos linfonodos profundos dá-se para os linfonodos pélvicos seguindo a rede da ilíaca interna, ilíaca externa e obturadores. Existem múltiplas conexões das redes linfáticas em todos os seus níveis; assim, a drenagem linfática do pênis é bilateral. (Cabanas, 1992).

O acometimento linfonodal pode levar à necrose da pele da região inguinal, infecção crônica, sepse e, até mesmo, hemorragia secundária à erosão dos vasos femorais por acometimento tumoral. Metástases à distância são incomuns, podendo acontecer em 1% a 10% dos casos e, quando presentes, acometem pulmão, fígado, ossos e cérebro, sempre em um curso mais tardio da doença. (Pettaway *et al.*, 2010).

Na apresentação inicial a lesão é usualmente confinada ao pênis, sendo o exame físico importante na definição do tamanho, localização e eventual envolvimento dos corpos penianos e da uretra. A inspeção cuidadosa da região inguinal bilateralmente deve ser realizada à procura de massas ou linfonodomegalias.

A confirmação diagnóstica através da biópsia da lesão é mandatória, deve ser realizada antes de qualquer tipo de tratamento e determina o tipo histológico e grau, invasão das estruturas penianas e invasão vascular.

### **Classificação Histológica**

A maioria dos tumores de pênis, como mencionado anteriormente, é de carcinoma de células escamosas (CCEP); porém há uma grande variação no comportamento clínico conforme o subtipo histológico. (Cubilla *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2009).

Inicialmente proposto por Cubilla em 1993, o CCEP foi subdividido de acordo com seu padrão de crescimento em quatro grupos: carcinoma de células escamosas de crescimento superficial, de crescimento vertical, verrucoso e multicêntrico. O carcinoma de células escamosas de crescimento superficial era o mais frequente e metástases linfonodais estavam presentes em cerca de 42% dos casos. (Cubilla *et al.*, 1993).

As metástases linfonodais estavam presentes em até 82% dos casos de crescimento vertical, em nenhum dos verrucosos e em apenas 33% dos multicêntricos. Em revisão subsequente, o autor reclassificou os subtipos histológicos em carcinoma de células escamosas subtipo usual, papilar, basalóide, condilomatoso, verrucoso e sarcomatóide. (Cubilla *et al.*, 2001).

#### *O carcinoma de células escamosas subtipo usual:*

O CCEP subtipo usual representa cerca de 48% a 65% dos tumores e podem apresentar-se desde uma lesão exofítica grosseiramente irregular branco-acinzentada a uma lesão plana e avermelhada ou ainda na forma de uma massa ulcerada. O comportamento deste tipo de lesão está relacionado a fatores como tamanho da lesão, grau histológico, profundidade da infiltração tumoral e pelo comprometimento perineural e vascular. A maioria das lesões é altamente queratinizada com moderado grau de diferenciação celular (grau II) com invasão até corpo esponjoso do pênis. Apresenta tamanho médio ao diagnóstico de 4,5 centímetros e normalmente compromete a lâmina própria, a túnica dartos, o corpo esponjoso em 45% dos casos e o corpo cavernoso em 35% dos casos. Este subtipo de carcinoma de pênis apresenta 28% de recorrência e metástases em linfonodos em 28% a 39% dos casos,

com taxa de mortalidade entre 20% a 38% e sobrevida em 10 anos de 78%. (Cubilla *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2009).

*O carcinoma de células escamosas subtipo verrucoso:*

O subtipo verrucoso representa cerca de 3% a 8% dos carcinomas de pênis. Tem característica de crescimento lento e seu diagnóstico habitualmente ocorre após vários anos da lesão inicial. É bem diferenciado e com limites bem precisos entre a lesão e a área sadia do pênis. Sabe-se que é uma lesão não relacionada ao HPV. (Cubilla *et al.*, 2010). Este subtipo de lesão caracteriza-se pelo crescimento local, podendo ser localmente agressivo, porém, não apresenta metástases linfonodais ou à distância. Seu crescimento raramente atinge a lâmina própria, o dartos ou o corpo esponjoso e a taxa de cura é de 100%. Porém, em pacientes com margens cirúrgicas comprometidas a taxa de recorrência pode chegar a 40%. A recorrência pode apresentar mudanças na histologia, sendo preconizado um tratamento mais agressivo.

*O carcinoma de células escamosas subtipo papilífero:*

O carcinoma de células escamosas subtipo papilífero representa cerca de 5% a 15% das lesões e é tipicamente verrucoso de baixo grau com bom prognóstico e raramente está associada à infecção por HPV. São lesões bem a moderadamente diferenciadas, graus I e II, com invasão de corpos cavernosos e de corpo esponjoso. Invasão vascular e perineural não são comuns neste tipo de lesão, mas podem ser encontradas em até 12% dos casos. (Guimarães *et al.*, 2009). A recorrência é baixa, em torno de 12% e o acometimento linfonodal também, inferior a 12% dos casos. A mortalidade deste tipo de tumor é de 0% a 6%. (Cubilla *et al.*, 2001).

*O carcinoma de células escamosas subtipo condilomatoso:*

O carcinoma verrucoso condilomatoso de pênis é de crescimento lento, de baixo grau, relacionado ao HPV e representa cerca de 7% a 10% dos tumores de pênis. A apresentação mais típica é de um tumor grau II com invasão de corpo esponjoso com baixo risco de acometimento linfonodal. A recorrência local após penectomia é de 10% e de metástases linfonodais de 17% a 25% dos casos. A mortalidade câncer-específica varia de 0% a 10%. (Cubilla *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2009).

#### O carcinoma de células escamosas subtipo basalóide:

O CCEP subtipo basalóide é um tumor agressivo e está relacionado à infecção por HPV em cerca de 70% a 80% dos pacientes. Este subtipo representa cerca de 4% a 10% dos casos. A lesão acomete mais frequentemente a glândula, mas também pode ser encontrada no prepúcio. Normalmente apresenta cerca de 2 a 5 centímetros e invade tanto corpo esponjoso quanto corpo cavernoso. São, por definição, lesões de alto grau e apresentam invasão perineural e vascular. Acometimento linfonodal está presente em cerca de 50% a 100% dos casos. A recorrência local é alta, ocorrendo em cerca de 36% dos casos de penectomia parcial. A sobrevida em 10 anos é de 76% e até 30% dos pacientes apresenta acometimento sistêmico. (Cubilla *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2009).

#### O carcinoma de células escamosas subtipo sarcomatóide:

O subtipo sarcomatóide corresponde a cerca de 1% a 3% dos carcinomas de células escamosas de pênis e é o mais agressivo. São de crescimento rápido, polipoides e infiltrativos com áreas hemorrágicas. Apresentam infiltração vascular e perineural e comprometimento de todas as camadas teciduais com ampla invasão do corpo cavernoso, levando frequentemente a margens positivas em pacientes submetidos à penectomia parcial. A recorrência local ocorre em aproximadamente dois terços dos pacientes. É subtipo pouco associado à infecção por HPV. O diagnóstico diferencial é com sarcoma e melanoma e a imuno-histoquímica geralmente é necessária para definição diagnóstica. As metástases linfonodais estão presentes ao diagnóstico em cerca de 75% a 89% dos casos e a mortalidade é alta, com 40% a 75% dos casos ocorrendo em até um ano do diagnóstico. (Velazquez *et al.*, 2005; Chaux *et al.*, 2009).

#### O carcinoma de células escamosas subtipo cuniculado:

O subtipo *cuniculatum* ou cuniculado é pouco frequente, de grande tamanho e geralmente de baixo grau. Costuma apresentar infiltração profunda especialmente ao corpo cavernoso. Em nenhum caso foi evidenciada metástase linfonodal ou à distância e a sobrevida é de 100%. (Barreto *et al.*, 2007).

O carcinoma de células escamosas subtipo pseudo-hiperplásico:

O carcinoma pseudo-hiperplásico é um subtipo de tumor de baixo grau que afeta preferencialmente pacientes idosos. Ocorre em geral pela oitava década de vida e é encontrado em áreas de lesões de líquen escleroso junto ao prepúcio. Não é associado à infecção por HPV e apresenta excelente prognóstico, sem relatos de disseminação linfática ou sistêmica.

O carcinoma de células escamosas subtipo adenoescamoso:

O subtipo adenoescamoso é raro e caracteriza-se pela presença de áreas glandulares junto ao padrão escamocelular. Acomete geralmente a glândula e a recorrência local pode ocorrer em até 25% dos casos. Metástases linfonodais podem ocorrer em até 50% dos casos, porém a mortalidade é baixa, variando de 0% a 14%. (Romero *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2009).

**Subtipos e sua relação com HPV**

Subtipo	Prevalência (%)	Relação com HPV
Usual	48-65	Não
Verrucoso	3-8%	Não
Papilífero	5-15	Raramente
Condilomatoso	7-10	Sim
Basalóide	4-10	Sim
Sarcomatóide	1-3	Não
Pseudo-hiperplásico	*	Não
Cuniculado	*	Não
Adenoescamoso	*	Não

\*tumores raros, sem prevalência definida

Há uma correlação entre os diferentes subtipos histológicos de CCEP com a presença de disseminação linfonodal e sistêmica. Esta também ocorre com o desfecho clínico, embora de forma menos significativa que o grau de diferenciação patológica e a invasão vascular e perineural.

A classificação de Broders, originalmente descrita para carcinoma epidermóide de pele, foi adaptada para uso em tumor de células escamosas de pênis. É utilizada para definir o grau de diferenciação da lesão, baseando-se no padrão de queratinização, de pleomorfismo nuclear e de número de mitoses. (Broders, 1921). Uma divisão em quatro graus foi inicialmente descrita, mas tornou-se comum a classificação baseada em três graus proposta por Maiche. (Maiche *et al.*, 1991). As lesões de baixo grau (graus 1 e 2) constituem cerca de 70% a 80% dos casos no diagnóstico.

Para estadiamento destes tumores, tanto a lesão primária quanto os linfonodos são facilmente acessados pelo exame físico. Sabe-se, entretanto, que a palpação da lesão pode não detectar cerca de 10% dos casos onde existe tumor ou considerar positivo quando não existe neoplasia outros 16%. (Horenblas *et al.*, 1991). Para lesões pequenas localizadas na glândula exames de imagem como ecografia e ressonância magnética são de pouca utilidade. Entretanto, quando há suspeita de invasão de corpo cavernoso, a ressonância magnética com contraste pode adicionar informações importantes no estadiamento, principalmente se a penectomia parcial é considerada. (Lont *et al.*, 2003).

Na avaliação dos linfonodos, em pacientes nos quais o exame físico é negativo, nenhum método de imagem mostrou sensibilidade para detectar micrometástases, sendo assim, o exame físico no paciente não obeso permanece como padrão ouro. Já para os pacientes nos quais o exame físico evidencia linfonodos palpáveis os exames de imagem podem ser úteis para determinar aqueles com pior prognóstico e, também, a presença metástases à distância. Nestes casos, tomografia de pulmão, abdome e pelve assim como cintilografia óssea podem ajudar no estadiamento. (Heyns *et al.*, 2010).

O estadiamento do CCEP segue a sétima edição do American Joint Committee on Cancer (AJCC) e Union for International Cancer Control (UICC), publicado em 2010, conforme os Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Estadiamento TNM do Câncer de Pênis - American Joint Committee on Cancer (AJCC)

TUMOR (T)	
Tx	Tumor não pode ser acessado
T0	Sem evidência de tumor
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Carcinoma verrucoso não invasivo
T1a	Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial sem invasão linfovascular e não é pouco diferenciado (grau 3-4)
T1b	Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial com invasão linfovascular ou é pouco diferenciado (grau 3-4)
T2	Tumor invade corpo esponjoso ou cavernoso
T3	Tumor invade uretra
T4	Tumor invade outras estruturas adjacentes
LINFONODOS (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser acessados <sup>1</sup>
pNx	Linfonodos regionais não podem ser acessados <sup>2</sup>
N0	Sem linfonodos inguinais aumentados ou palpáveis <sup>1</sup>
pN0	Sem linfonodos regionais metastáticos <sup>2</sup>
N1	Linfonodo inguinal unilateral, palpável e móvel <sup>1</sup>
pN1	Metástase em linfonodo inguinal único <sup>2</sup>
N2	Múltiplos linfonodos inguinais ou linfonodos bilaterais, móveis <sup>1</sup>
pN2	Metástases em múltiplos linfonodos inguinais ou bilaterais <sup>2</sup>
N3	Massa linfonodal inguinal fixa, linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral <sup>1</sup>
pN3	Extensão extranodal ou linfonodos pélvicos unilateral ou bilateral <sup>2</sup>
METASTASE A DISTANCIA (M)	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástase à distância <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Baseado na palpação e exames de imagem

<sup>2</sup> Baseado na biópsia ou excisão cirúrgica

<sup>3</sup> Metástase linfonodal além da pelve verdadeira ou metástase visceral ou óssea

Quadro 2. Estadiamento do Câncer de Pênis segundo American Joint Committee on Cancer (AJCC)

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

## **Tratamento**

O objetivo terapêutico principal no tratamento do CCEP deve ser a excisão completa da lesão, o controle linfático regional e, quando possível, aliar os aspectos estéticos e funcionais do pênis. A excisão cirúrgica é fator primordial no manejo de tais lesões e quando realizada adequadamente pode ser curativa. Assim, o padrão ouro no tratamento da neoplasia de pênis consiste na penectomia.

Diversas terapias alternativas tais como radioterapia, quimioterapia e suas combinações já foram utilizadas no tratamento das lesões primárias de CCEP. Procedimentos preservadores do pênis, tal como a cirurgia micrográfica de Mohs e terapias com laser já foram utilizados em outros tumores cutâneos com sucesso e podem eventualmente ser aplicadas no pênis.

### **Cirurgia:**

A microcirurgia de Mohs, descrita em 1985, é uma técnica de excisão da lesão através de finas lâminas horizontais utilizando-se de microscópio para examinar cada camada através de técnicas de congelação até a obtenção de margens negativas, preservando-se, assim, o máximo possível do órgão. Tem sua melhor indicação no carcinoma *in situ* e em lesões pequenas e superficiais do pênis, não maiores que 3 centímetros. As principais complicações associadas a esta técnica são estenose de meato uretral e deformidade anatômica da glândula. (Mohs *et al.*, 1985).

A utilização de laser, mais comumente o Nd:YAG para tratamento das lesões de pênis tem como principais vantagens a destruição do tumor com preservação do pênis e de suas funções, promovendo a cauterização de pequenos vasos e nervos diminuindo a incidência de sangramento e dor no pós-operatório. Como desvantagens, entretanto, apresenta dificuldade de documentação histológica e conseqüentemente de determinar a profundidade da invasão do tumor. A utilização de laser para tratamento dos tumores de pênis é terapêutica alternativa e deve ser realizada com o entendimento de que as recorrências locais podem ser mais frequentes e, sendo assim, vigilância ativa e acompanhamento rigoroso devem ser realizados. Na eventualidade de recorrência após tratamento com laser a penectomia parcial ou a amputação é preconizada.

Pacientes com pequenas lesões envolvendo o prepúcio podem ser tratados com ampla circuncisão com confirmação de margens através de técnicas de congelação no

transoperatório. Tumores invasivos envolvendo a glândula ou sulco coronal podem ser adequadamente manejados com penectomia parcial. Na maioria dos casos, permite manter cerca de 4 centímetros de haste peniana, o que permite a micção em posição ortostática e coto com possibilidade de intercuro sexual com penetração vaginal. A congelação no transoperatório deve confirmar margens livres de tumor. A recorrência local ocorre em aproximadamente 10% dos casos. Já os pacientes com tumores grandes ou infiltrativos envolvendo a glândula ou a haste peniana, nos quais a adequada excisão da lesão impossibilita a manutenção de remanescente peniano funcional, são melhor manejados com penectomia total.

A complicação pós-operatória mais comum nas penectomias parciais e totais é a estenose do meato uretral. Os pacientes devem ser alertados para tal complicação e orientados a realizarem dilatação uretral periódica.

### **Radioterapia:**

O tratamento primário da lesão através de radioterapia pode ser alternativa na preservação do órgão para casos selecionados de lesões de tumores T1 ou T2 com menos de 4 centímetros de diâmetro. (Gotsadze *et al.*, 2000; Crook *et al.*, 2009). Tanto a radioterapia externa quanto a braquiterapia são utilizadas no tratamento da lesão primária. Antes do tratamento com radioterapia, é necessário circuncisar o paciente para melhor expor o tumor, diminuir a infecção de pele geralmente associada e prevenir o edema de prepúcio com consequente fimose ou parafimose.

A radioterapia externa tem a vantagem de ser amplamente disponível e costuma ser empregada em doses que variam de 60Gy até 74Gy fracionados em 25 a 37 sessões em um período de cinco a sete semanas. O paciente deve ficar em posição supina e o pênis é envolto em uma caixa de acrílico para minimizar as variações de posição do órgão e consequentemente da lesão. O controle local em cinco anos com radioterapia externa varia de 44% a 69,7%, resultado inferior ao obtido com as técnicas tradicionais de amputação peniana. Entretanto, cerca de 50% dos pacientes submetidos à radioterapia externa podem evitar uma amputação peniana. (Crook *et al.*, 2009). A braquiterapia com implante de irídio-192 geralmente pode ser utilizada como alternativa no tratamento da lesão primária. O controle local parece ser superior quando comparado à radioterapia externa, variando de 70% a 87% em cinco anos e com taxa de preservação do órgão de 74% a 88%. (De Crevoisier *et al.*, 2009).

As complicações mais comuns do tratamento com radioterapia são a estenose do meato uretral em 20% a 35% dos casos, necrose da glândula em 10% a 20% dos casos e fibrose do corpo cavernoso, que ocorre mais tardiamente. Com a braquiterapia a incidência de estenose de meato uretral pode ser superior a 40%. (Zouhair *et al.*, 2001).

A radioterapia não é recomendada para pacientes com indicação de tratamento profilático dos linfonodos da região inguinal. (Graafland *et al.*, 2011). Pode ser utilizada nos pacientes com linfonodomegalias mas apresenta resultados inferiores quando comparado à cirurgia. (Kulkarni e Kamat, 1994). Pode ser utilizada como palição em pacientes com massas linfonodais inoperáveis e pode, eventualmente, em associação com quimioterapia, tornar pacientes com linfonodos inoperáveis em ressecáveis.

### **Doença Linfonodal:**

A presença e a extensão de metástases em linfonodos inguinais são os fatores prognósticos mais importantes na sobrevivência de pacientes com CCEP. Diferentemente de outros tumores do trato geniturinário nos quais o acometimento linfonodal requer tratamento sistêmico, a linfadenectomia regional no carcinoma de pênis pode ser curativa.

Nos pacientes com aumento linfonodal no diagnóstico da neoplasia, classicamente o uso de antibiótico num período de quatro a seis semanas é proposto, tendo em vista que a presença de metástase linfonodal comprovada ocorre em aproximadamente 45% dos casos. (Saisorn *et al.*, 2006). Entretanto, a fim de evitar tal atraso no tratamento dos pacientes com acometimento linfonodal, diversos autores têm proposto a realização de citologia por punção aspirativa do linfonodo. (O'Brien *et al.*, 2017).

Nos pacientes sem aumento linfonodal no diagnóstico da neoplasia, a linfadenectomia regional precoce parece apresentar melhora na sobrevivência quando comparada à linfadenectomia realizada posteriormente nos pacientes que se encontravam em vigilância. (Kroon *et al.*, 2005). Ainda, a cura através da linfadenectomia nos pacientes que realizam observação e apresentam recorrência linfonodal ocorre em menor frequência. (Ornellas *et al.*, 1994; Kroon *et al.*, 2005).

Assim, para pacientes com fatores de baixo risco de metástase linfonodal, tais como carcinoma *in situ*, carcinoma verrucoso e estágio T1 de grau 1 a observação expectante é preconizada, visto que o acometimento dos linfonodos neste grupo varia de 0% a 16%. (Pizzocaro *et al.*, 2010). Para pacientes com fatores de alto risco de metástase linfonodal, tais como T2 ou T3, grau III, invasão perineural ou vascular a linfadenectomia inguinal

bilateral está indicada, visto que o acometimento linfonodal neste grupo é superior a 50%. (Kroon *et al.*, 2005).

As complicações associadas à linfadenectomia são necrose de pele, infecção de ferida operatória, linfedema de membros inferiores e bolsa escrotal, trombose venosa profunda e morte. A necrose de pele pode ocorrer em até 30% dos casos. (Catalona, 1988). Em 1988, Catalona promoveu modificações na técnica de linfadenectomia inguinal completa (superficial e profunda), envolvendo incisão menor com menor campo de dissecação, preservação da veia safena e flaps cutâneos mais espessos, minimizando as possíveis complicações do procedimento. (Catalona, 1988).

Mais recentemente, Tobias-Machado e Sotelo descreveram a técnica de linfadenectomia inguinal por técnica videoendoscopia e robô-assistida, com resultados comparáveis à técnica tradicional e menor taxa de complicações. (Sotelo *et al.*, 2007; Tobias-Machado *et al.*, 2007). Estudos adicionais com maior número de pacientes e maior tempo de seguimento são necessários para firmar a adoção destas novas técnicas cirúrgicas como rotina.

### **Quimioterapia:**

Pacientes com linfonodos positivos e que realizaram linfadenectomia (N2-N3) podem beneficiar-se com uso de quimioterapia adjuvante, principalmente quando administrado terapia tripla baseada em cisplatina, 5-fluoracil e paclitaxel (TPF) por três a quatro ciclos chegando a 52,6% de sobrevida livre de doença em período médio de 42 meses. (Giannatempo, 2014).

Já para pacientes com massas linfonodais (cN3), a linfadenectomia não costuma ser recomendada como terapia inicial, uma vez que a ressecção cirúrgica completa é pouco provável. Assim, a quimioterapia neoadjuvante, preferencialmente com tripla combinação que inclua cisplatina e taxano, é recomendada quando possível. (Hakenberg *et al.*, 2006).

Para pacientes com doença metastática visceral, a quimioterapia paliativa deve ser baseada no uso de taxanos, embora os resultados sejam pouco encorajadores. (Pond *et al.*, 2014).

## Survivina e Apoptose Celular

A apoptose foi inicialmente reconhecida como mecanismo de destruição celular em 1972. (Kerr *et al.*, 1972). É uma forma de morte celular programada através da ativação de uma série coordenada de eventos executados internamente pela célula. Está naturalmente envolvida em diversos contextos, tais como durante o desenvolvimento, na homeostase celular de diversos tecidos, como mecanismo de defesa, em células lesadas por doença ou por agentes nocivos e no envelhecimento.

Durante a apoptose, ocorre retração celular com compactação das organelas intracelulares, condensação da cromatina - que é a característica mais marcante do processo levando à agregação da cromatina na periferia da membrana celular - formação dos corpúsculos apoptóticos com degradação do DNA e sua consequente fagocitose.

Uma característica específica da apoptose é a hidrólise de proteínas através da ativação das proteases denominadas caspases. Elas são proteases sintetizadas como zimógenos inativos. Quando ativadas produzem um processo irreversível de destruição celular. Podem ser subdivididas em dois grupos, as caspases iniciadoras (caspases-8 e 9) e as caspases executoras (caspases-3, 6 e 7). (Marsoni e Damia, 2004).

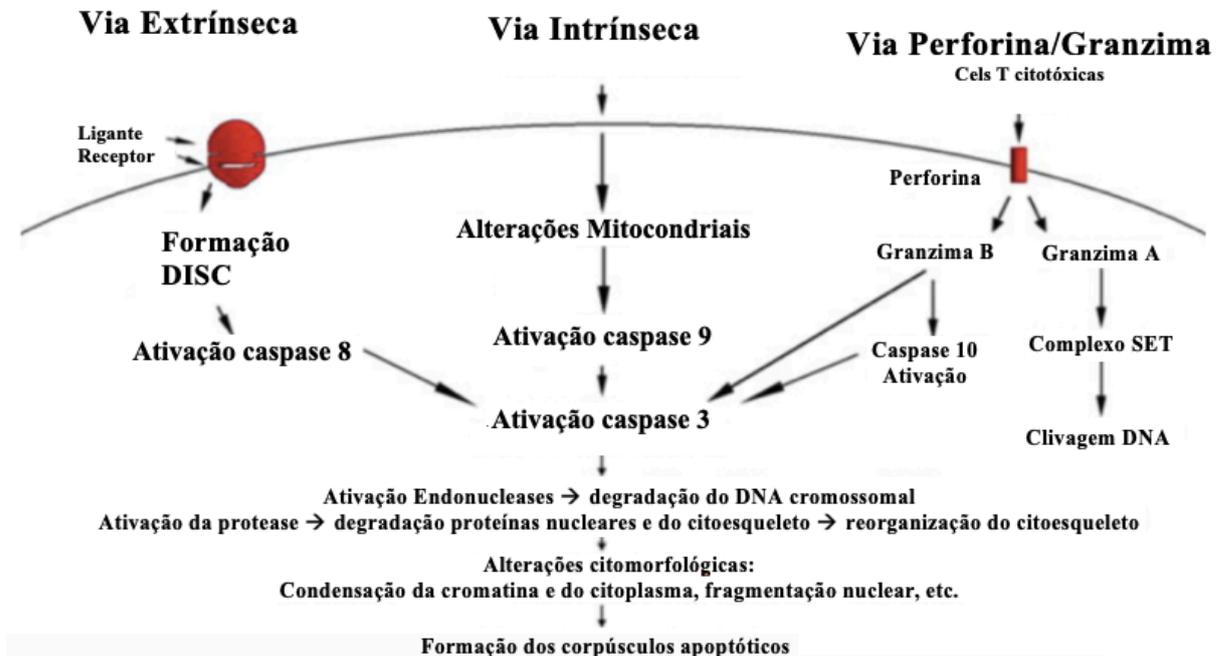
A via intrínseca ocorre através da liberação de proteínas através do espaço intermembrana da mitocôndria para o citoplasma. As proteínas envolvidas nesse processo são o citocromo *c*, o inibidor direto da apoptose (DIABLO), o segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria (SMAC) e a endonuclease G, dentre outras. O citocromo *c* desempenha papel fundamental nesse processo. Uma vez liberado no citoplasma celular liga-se à proteína APAF-1 promovendo a sua ativação que, posteriormente, forma o corpúsculo apoptótico. Através da ativação da caspase-9 e da caspase-3, desencadeia-se a morte celular por apoptose. (Riedl e Shi, 2004).

A via extrínseca ocorre pela interação de um ligante extracelular com um receptor transmembrana (receptor TNF). Esta ligação promove a ativação das caspases e formação do DISC, um complexo sinalizador de indução da morte celular. Este, por sua vez, promove ativação da caspase-8, que leva à ativação da caspase-3 e, conseqüentemente, à morte celular. (Elmore, 2007).

Existe uma via adicional de morte celular mediada por células T e pela perforina-granzima. A via de perforina/granzima pode induzir a apoptose através da granzima-B ou da granzima-A. A granzima-A ocorre por mecanismos caspase-independentes. As vias extrínseca, intrínseca e da granzima-B convergem para a mesma via de execução. Esta via é

iniciada pela clivagem da caspase-3 e resulta na fragmentação do DNA, degradação das proteínas citoesqueléticas e nucleares levando à apoptose celular.

**Figura 1. Vias da apoptose** (adaptado de Elmore, 2007)



A proteína survivina tem sido estudada recentemente devido à sua expressão em tecidos neoplásicos, sendo rara a sua presença em tecido adulto normal. (Duffy *et al.*, 2007; Pennati *et al.*, 2008). O gene codificador da survivina humana foi clonado pela primeira vez por Ambrosini *et al* em 1997. (Ambrosini *et al.*, 1997).

O gene da survivina humana, localizado no cromossomo 17q25, é composto por quatro exons e três introns com aproximadamente 14,7kb com 142 aminoácidos em sua cadeia. Pode ser identificada através de RNAm e quantificada por técnicas de proteômica ou através de imuno-histoquímica. (Qin *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014).

Foram descritas seis variantes do gene da survivina em humanos. A forma mais comumente encontrada (“*wild type*”) apresenta localização citoplasmática. (Caldas *et al.*, 2007). A forma survivina -2B é gerada pela inserção de um exon alternativo (exon 2B) e também apresenta localização citoplasmática. A survivina -3B é resultado da introdução do exon 3B. (Badran *et al.*, 2004). A survivina -deltaEx3 obtida através da remoção do exon 3, é preferencialmente localizada no núcleo. As outras duas formas são a survivina 2alfa e a survivina 3alfa, ambas com modificações no intron 2. (Huang *et al.*, 2011).

A survivina exerce múltiplas funções no processo biológico celular, tais como supressão da apoptose através de mecanismos caspase-dependentes e independentes, regulação da divisão celular e indução da angiogênese. (Tanaka *et al.*, 2000).

Quando comparada a tecidos adultos normais, a survivina apresenta maior expressão em tecidos tumorais. (Adida *et al.*, 1998). Nas células malignas, o aumento da expressão dessa proteína é atribuído a uma série de mecanismos moleculares e genômicos, tais como amplificação gênica e desmetilação. (Qin *et al.*, 2014). Esta elevação está comumente associada com aumento do índice de proliferação celular e redução da apoptose.

A expressão aberrante da survivina nas células está implicada na etiologia de diversos tipos de neoplasias como tumores colorretais, ovarianos, pulmonares não-pequenas células, dentre outros. (Altieri, 2001). Além disso, associa-se com progressão da doença, resistência a múltiplas drogas, piora no prognóstico e na expectativa de vida em diversos tumores. (Margulis *et al.*, 2008; Rosato *et al.*, 2013).

No quadro abaixo, alguns estudos listando a expressão da survivina em diferentes tipos de neoplasias:

**Quadro 3.** Expressão da survivina em diferentes neoplasias

<b>Câncer</b>	<b>Expressão (%)</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
Pulmão	83%	IHQ	(Lu <i>et al.</i> , 2004)
Testículo	100%	PCR	(Weikert <i>et al.</i> , 2005)
Gástrico	76 – 68%	IHQ - RTPCR	(Li <i>et al.</i> , 2004) ; (Yu <i>et al.</i> , 2002)
Bexiga	58%	IHQ	(Ku <i>et al.</i> , 2004)
Rim	79%	IHQ	(Byun <i>et al.</i> , 2007)
Ovário	73,5%	IHQ	(Cohen <i>et al.</i> , 2003)
Pâncreas	88%	IHQ	(Sarela <i>et al.</i> , 2002)
Hepático	41%	PCR	(Ikeguchi <i>et al.</i> , 2002)
Oroesofágico	80%	IHQ	(Grabowski <i>et al.</i> , 2003)
Reto	51%	IHQ	(Knutsen <i>et al.</i> , 2004)
Mama	70,7%	IHQ	(Tanaka <i>et al.</i> , 2000)

IHQ: imuno-histoquímica; PCR: reação em cadeia de polimerase; RTPCR: reação em cadeia de polimerase em tempo real

Em estudo realizado por Weickert e colaboradores, no qual a expressão de survivina foi correlacionada com grau de diferenciação celular em tumor de testículo, foi evidenciado que níveis elevados de survivina estavam associados a maior grau de indiferenciação do tumor. (Weikert *et al.*, 2005). A alta expressão de survivina já foi descrita como fator de pior

prognóstico através da análise de sobrevida livre de doença, sobrevida global e recorrência local conforme estudos realizados em câncer de bexiga (Ku *et al.*, 2004), reto (Knutsen *et al.*, 2004), pulmão (Lu *et al.*, 2004; Oshita *et al.*, 2004; Rosato *et al.*, 2013), estômago (Li *et al.*, 2004) e pâncreas (Sarela *et al.*, 2002). Até o momento não há estudos descrevendo a expressão da survivina em carcinoma epidermóide de pênis.

Diversos trabalhos tem demonstrado correlação entre tumores sólidos e o polimorfismo da survivina, em especial tumores colorretais, gástricos e uroteliais. (Fukuda e Pelus, 2006; Margulis *et al.*, 2008). Assim, a survivina parece ser uma ferramenta para auxiliar na avaliação do prognóstico de neoplasias malignas.

## **P16**

A expressão imuno-histoquímica de p16 tem sido amplamente utilizada como marcador da presença de infecção por HPV nos carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço e nos carcinomas de cérvix uterina. (Kreimer *et al.*, 2005). Embora a associação do HPV nos tumores de cabeça e pescoço seja um fator prognóstico favorável, o papel desta infecção ainda não está bem definido no CCEP. (Flaherty *et al.*, 2014).

A relação entre infecção por HPV e o CCEP foi demonstrada em coorte com 57 pacientes descrita por Zargar-Shoshtari. Neste estudo, através de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* para HPV de alto risco, 40% dos pacientes eram positivos para p16 e 42% dos pacientes apresentavam HPV, definindo a análise imuno-histoquímica como biomarcador da infecção por HPV. (Zargar-Shoshtari *et al.*, 2016).

Bezerra e colaboradores, em pesquisa realizada na Johns Hopkins Medical Institutions, identificaram que a positividade do HPV e a expressão imuno-histoquímica do p16 está associada à presença do subtipo histológico basalóide e, ainda, à presença de invasão linfovascular. Entretanto, a positividade para HPV não foi fator preditivo na avaliação de desfecho clínico. (Bezerra *et al.*, 2015).

Tang e colaboradores demonstraram expressão de p16 positiva em 50% dos pacientes de sua coorte com 119 indivíduos. Não foi identificada relação entre a expressão imuno-histoquímica de p16 e grau do tumor, presença de invasão linfovascular e linfonodal. Entretanto, para os pacientes que foram submetidos à linfadenectomia, a recorrência foi maior nos que não expressaram positividade para p16. (Tang *et al.*, 2015).

Steinestel e colaboradores demonstraram que a expressão imuno-histoquímica de p16 era inversamente associada à invasão tumoral embora não tenha sido correlacionada com a presença de linfonodos positivos ou metástases à distância. (Steinestel *et al.*, 2015).

A positividade para p16 no CCEP pode indicar uma doença de comportamento local menos agressiva, mas seu valor como preditor de sobrevida ainda é questionável.

## **Ki-67**

Ki-67 é uma proteína expressa especificamente na fase G2/M do ciclo celular e está envolvida no controle da mitose. É marcador tumoral de proliferação celular.

Berdjis e colaboradores reportaram que a expressão imuno-histoquímica de Ki-67 no carcinoma de pênis estava associada com tumor localmente avançado, disseminação linfonodal e progressão clínica da doença. (Berdjis *et al.*, 2005). Tais achados foram posteriormente suportados por estudo chinês em pacientes submetidos a penectomia e linfadenectomia inguinal que também identificou correlação entre expressão imuno-histoquímica de Ki-67 e metástases linfonodais. (Zhu *et al.*, 2007).

Outros estudos, entretanto, evidenciaram pouco benefício no uso rotineiro do Ki-67 no CCEP quando comparado aos critérios clínicos e histopatológicos convencionais. (Guimarães *et al.*, 2007; Stankiewicz *et al.*, 2012).

## **PD-L1**

A via de morte celular programada-1 (PD-1/PD-L1) está envolvida no surgimento/crescimento de diversas células tumorais. (Rabinovich *et al.*, 2007) O PD-L1 na célula tumoral tem a capacidade de interagir com o receptor PD-1 nas células T citotóxicas promovendo uma inativação das mesmas, inibindo assim a resposta imune local. (Keir *et al.*, 2008).

Diversos estudos avaliando a eficácia da terapia anti-PD-1/PD-L1, também denominada terapia de inibição imunológica, em tumores sólidos já demonstram bons resultados. (Brahmer *et al.*, 2015; Motzer *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2015). Sabe-se que a resposta à terapia imune anti-PD-1 está diretamente associada à expressão tumoral de PD-L1. (Topalian *et al.*, 2012). Assim, para prever a resposta tumoral à imunoterapia no CCEP, é fundamental compreender a expressão imuno-histoquímica de PD-L1 nesta doença.

Em estudo recente, Udager e colaboradores, em uma coorte de 37 pacientes com CCEP, demonstraram que a expressão de PD-L1 nas células tumorais estava associada à presença de metástases linfonodais e menor sobrevida câncer específica. (Udager *et al.*, 2016).

Posteriormente, em uma coorte composta por 116 pacientes portadores de CCEP, Deng e colaboradores identificaram que cerca de 53,4% dos pacientes apresentavam coloração positiva para PD-L1 e, ainda, que a alta expressão de PD-L1 pelo tumor estava associada à pior sobrevida câncer específica. (Deng *et al.*, 2017).

Até o presente momento, há poucos estudos avaliando a expressão de biomarcadores no CCEP e sua correlação com fatores prognósticos. A identificação de tais biomarcadores pode ajudar na melhor estratificação de agressividade da doença, melhor identificação de prognóstico e, conseqüentemente, em melhor ajuste de tratamento, sendo mais agressivo quando necessário. Compreender melhor a expressão imuno-histoquímica do PD-L1 no CCEP poderá propiciar novas opções terapêuticas para doença avançada.

## **HIPÓTESE**

A expressão imuno-histoquímica de biomarcadores pode servir como preditor prognóstico no carcinoma de células escamosas de pênis.

## **OBJETIVOS DO ESTUDO**

Objetivo Geral:

Avaliar o papel preditor de biomarcadores teciduais no CCEP.

Objetivos Específicos:

Verificar a expressão imuno-histoquímica da survivina, do Ki-67, do p16 e do PD-L1 no CCEP.

Correlacionar a expressão imuno-histoquímica da proteína survivina, do Ki-67, do p16 e do PD-L1 com a sobrevida em 5 anos dos paciente com CCEP.

Correlacionar a expressão imuno-histoquímica da proteína survivina, do Ki-67, do p16 e do PD-L1 com fatores prognósticos estabelecidos no CCEP.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Delineamento:**

Trata-se de um estudo de biomarcadores, em uma coorte retrospectiva, com indivíduos do sexo masculino portadores de CCEP nos quais foi avaliada a expressão de survivina, de Ki-67, de p16 e de PD-L1 por técnica de IHQ. Correlações foram realizadas de forma retrospectiva.

### **População em estudo**

Devido à raridade da doença estudada, este estudo foi realizado com amostra de conveniência. Foram incluídos 40 indivíduos do sexo masculino submetidos a cirurgia de penectomia parcial ou total entre 1998 e 2016 no Serviço de Urologia do Hospital São Lucas da PUC/RS com diagnóstico anatomopatológico de CCEP e cujo seguimento clínico tenha sido realizado no Ambulatório de Urologia e de Uro-oncologia da mesma instituição. Cinco pacientes foram excluídos do estudo por falta de dados.

Os prontuários dos pacientes foram revisados para idade, tamanho da lesão, subtipo histológico, presença de invasão linfonodal, realização de cirurgia de linfadenectomia inguinal, estadiamento patológico, margens cirúrgicas, invasão vascular, invasão perineural e seguimento pós-operatório, incluindo óbito. Para definição da sobrevida global, os pacientes que não tinham registro atualizado de consultas na instituição foram contatados por telefone para informações de saúde e/ou data de óbito. A avaliação de sobrevida global e a coleta de dados clínicos teve término proposto para final do mês de outubro de 2017.

### **Avaliação imuno-histoquímica**

Lâminas foram obtidas de blocos de parafina no Serviço de Patologia do HSL e posteriormente revisadas por um segundo patologista. Foi escolhida área representativa do tumor e realizada a análise imuno-histoquímica para reatividade com survivina, Ki67, P16 e PD-L1.

Secções de 3 micra em micrótomo rotatório(LEICA RT 2150) de tecidos fixados em formol neutro tamponado a 10% e embebidos em parafina foram montadas em lâminas de vidro revestidas com silano (3-aminopropilsilano). Após, as lâminas foram desparafinizadas em estufa histológica (De LEO) na temperatura de 60 graus Celsius por 30 minutos. Para cada painel foi escolhido e testado, previamente, um controle positivo, utilizando os dados de diluição dos fabricantes. Seguem as especificações dos anticorpos:

- anti-survivina (clone 12C4 do laboratório DAKO,USA), diluição 1:50
- Ki67 (clone MIB1, DAKO,USA), diluição 1:150
- Anti-PDL-1 (clone ZR3,Zeta-corporation), diluição 1:200
- Anti-P16 (clone G75-405,Zeta-corporation), diluição1:100

O processamento foi realizado por sistema automatizado DAKO AUTOSTEINER LINK 48, contendo os reagentes para coloração composto por tampão (wash buffer 20%), vision flex peroxidase-blocking, flex+mouse, flex+rabbit, flexHRP.

Após o processamento automático, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina de Harris (1 minuto), amônia (2 minutos), desidratadas em série de álcool etílico a 90%, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá.

### **Análise de Imunocoloração**

A análise de imunocoloração foi realizada em microscópio óptico Olympus CX 41, sob magnificações de 100x, 200x e 400x por patologista treinado. Para cada anticorpo, foi padronizada a leitura para posterior análise estatística:

A avaliação da survivina foi feita em, no mínimo, dez campos de grande aumento, tendo sido considerada a porcentagem de células coradas para reatividade citoplasmática e/ou em membranas nas células neoplásicas. Foi definido como positiva a expressão  $\geq 5\%$  das células tumorais coradas. Adicionalmente, foi utilizado o escore de intensidade das células coradas, variando de 0 a +++; sendo que 0=nula, += reatividade fraca, ++= reatividade moderada e +++=reação forte. O controle positivo de referência foi de parênquima testicular; o controle negativo foi o próprio tecido epitelial circunjacente não neoplásico. Os parâmetros utilizados na análise imuno-histoquímica das lâminas coradas para survivina foram previamente definidos por Cohen et al.(Cohen *et al.*, 2003)

A expressão do Ki-67 foi realizada utilizando aumento de 400X, e pelo menos 500 células foram contadas em campos bem preservados de tumor. O controle foi o tecido da amígdala. O grau de expressão foi relatado como porcentagem de células com núcleos marcados e considerados positivos quando  $\geq 10\%$ .

A expressão imuno-histoquímica do PD-L1 positiva produz coloração completa ou basolateral de qualquer intensidade. O controle utilizado foi amígdala. Foi avaliada por percentual de membrana e/ou citoplasma positivos. A categorização foi realizada através de percentual de células tumorais coradas com qualquer intensidade ( $\geq 1\%$ ) em 5 campos de grande aumento.

A coloração positiva para o anti-P16 incluiu a coloração nuclear e citoplasmática por percentual do volume do tumor. A categorização foi realizada através de percentual de células tumorais coradas definindo positividade quando corado mais de 10% das células ( $\geq 10\%$ ) em cinco campos de grande aumento. O controle foi tecido de carcinoma de colo uterino.

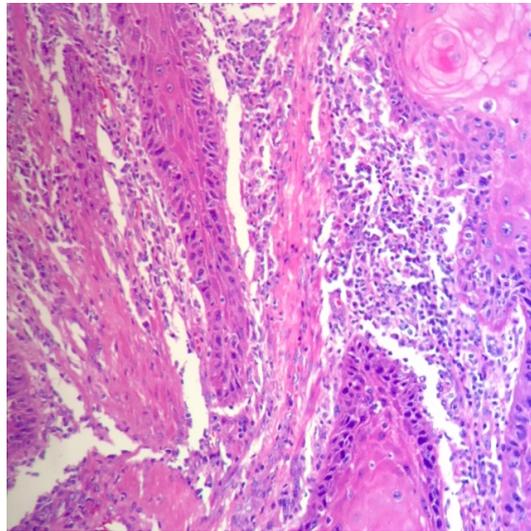
## **ÉTICA**

Considerando o delineamento do estudo, há riscos mínimos para os sujeitos da pesquisa relacionados com este trabalho. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP) do Hospital São Lucas da PUCRS – código SIPESQ 6945 e os pesquisadores assinaram o termo de responsabilidade sobre a confidencialidade de dados.

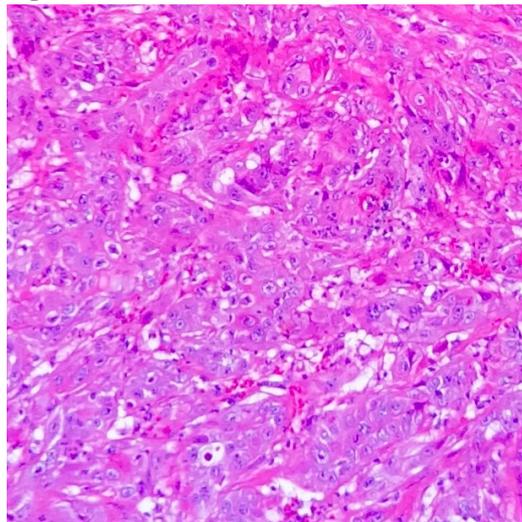
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

As figuras a seguir ilustram as colorações obtidas na avaliação anátomo-patológica através de técnicas de hematoxilina e eosina e com as imuno-histoquímicas realizadas nos pacientes com CCEP.

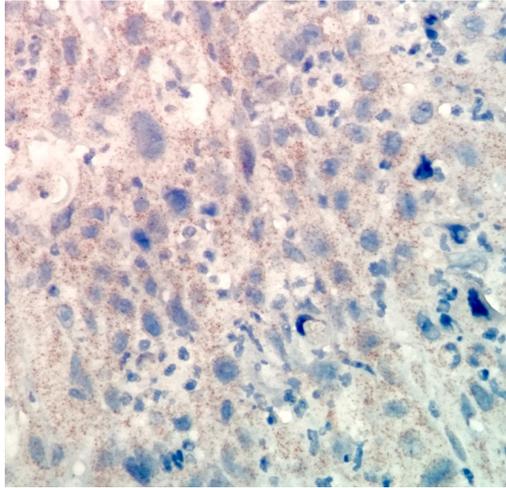
**Figura 2:** Hematoxilina-eosina no CCEP Grau 2; aumento de 200X



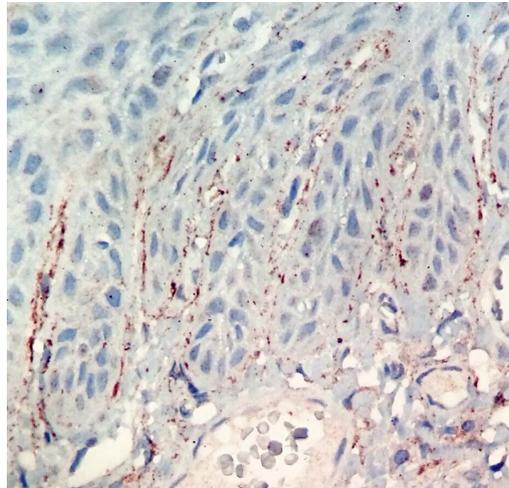
**Figura 3:** Hematoxilina-eosina no CCEP Grau 3; aumento de 200X



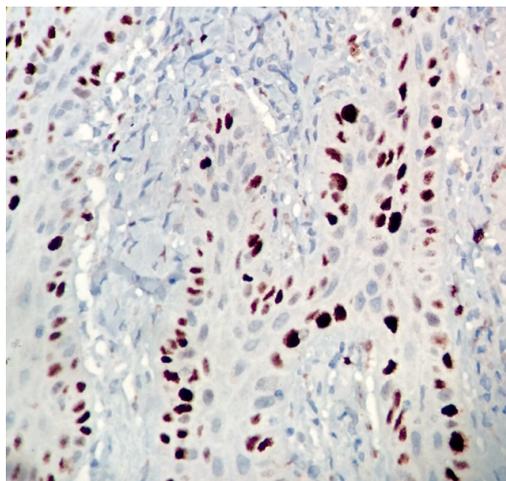
**Figura 4:** IH para Survivina, marcação citoplasmática; aumento de 400X



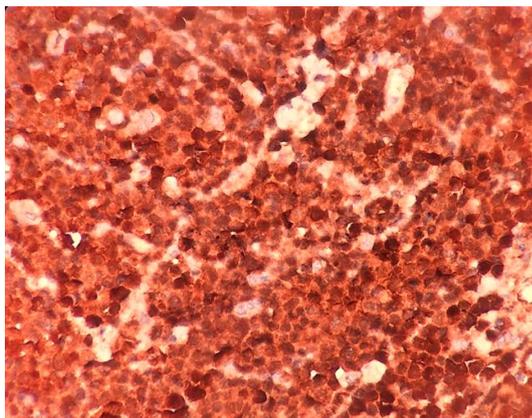
**Figura 5:** IH para Survivina, marcação de membrana; aumento de 400X



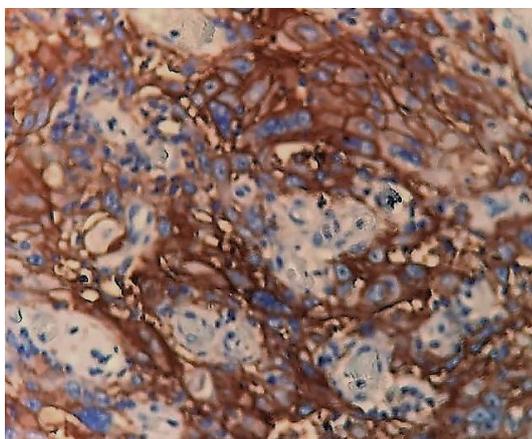
**Figura 6:** IH para Ki67, marcação nuclear ; aumento de 400X



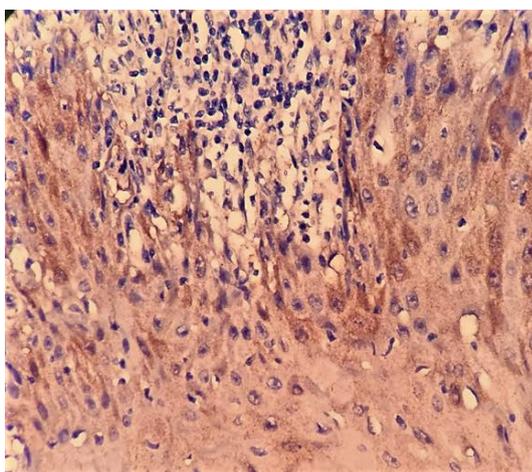
**Figura 7:** IH para p16, coloração nuclear; aumento 400X



**Figura 8:** IH para PD-L1, coloração de membranas; aumento 400X



**Figura 9:** IH para PD-L1, coloração citoplasmática; aumento 200X



## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados quantitativos foram descritos por mediana e valores mínimo e máximo. Dados categóricos foram apresentados por contagens e percentuais. Comparações entre dados quantitativos foram realizadas pelo teste U de Mann-Whitney e entre dados categóricos pelo teste exato de Fisher. Adicionalmente foram obtidas curvas de Kaplan-Meier para estimar as taxas de sobrevida com significância estatística pelo teste de log-rank. Medidas de força de associação baseadas no hazard ratio e com seus respectivos intervalos de confiança foram estimadas através da regressão de azares proporcionais de Cox. O nível de significância adotado no estudo foi de  $\alpha=0,05$ . Os dados foram processados e analisados com o programa IBM-SPSS versão 22.0.

## RESULTADOS

### Caracterização da amostra

Dos 35 pacientes analisados, a idade média foi de 64,6 anos com 12,41 anos de desvio padrão. Eram da raça branca 33 pacientes. O tamanho médio das lesões primárias foi de 4cm, variando de 1,5 a 16cm. Apresentavam acometimento do prepúcio 23 pacientes (65,7%), 33 pacientes (94,2%) da glândula, 17 pacientes (48,5%) do corpo esponjoso, nove pacientes (25,7%) do corpo cavernoso e 19 pacientes (54,3%) da uretra. A invasão perineural foi detectada em oito pacientes (22,8%) e a invasão vascular estava presente em cinco pacientes (14,2%).

O subtipo usual foi diagnosticado em 31 pacientes (88,5%) e o verrucoso em quatro pacientes (11,5%). Quanto ao grau da lesão, 13 pacientes (37,2%) apresentavam lesão grau I, 19 pacientes (54,3%) apresentavam lesão grau II e apenas três pacientes (8,6%) apresentavam lesão grau III.

A penectomia parcial foi realizada em 22 pacientes (62,8%) e a penectomia total em 13 pacientes (37,2%). Foi realizada linfadenectomia inguinal superficial e profunda em 15 pacientes (42,8%), sendo o acometimento linfonodal positivo detectado em dez pacientes (66,6%). Nos pacientes que tiveram a linfadenectomia positiva, o número de linfonodos acometidos variou de um a seis.

Dez pacientes (28,5%) encontravam-se em estágio clínico I, 17 pacientes (48,5%) em estágio II, três pacientes (8,5%) em estágio IIIa, quatro pacientes (11,4%) em estágio IIIb e apenas um paciente (2,8%) em estágio IV.

O seguimento médio dos paciente foi de 46,87 meses, variando de 1,12 a 209,54 meses. Dos 35 pacientes, 13 (37,1%) evoluíram ao óbito no período estudado.

As características da população estudada estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Características da população em estudo**

<b>Pacientes</b>	<b>35</b>	<b>100%</b>
Branco	33	94,2%
Negro	02	5,8%
<b>Subtipo</b>		
Usual	31	88,5%
Verrucoso	04	11,5%
<b>Local</b>		
Prepúcio	23	65,7%
Glande	33	94,2%
Corpo Espongioso	17	48,5%
Corpo Caveroso	09	25,7%
Uretra	19	54,3%
<b>Grau I</b>	13	37,2%
II	19	54,3%
III	03	8,6%
<b>Penectomia</b>		
Parcial	22	62,8%
Total	13	37,2%
<b>Linfadenectomia</b>	15	42,8%

### **Análise imuno-histoquímica**

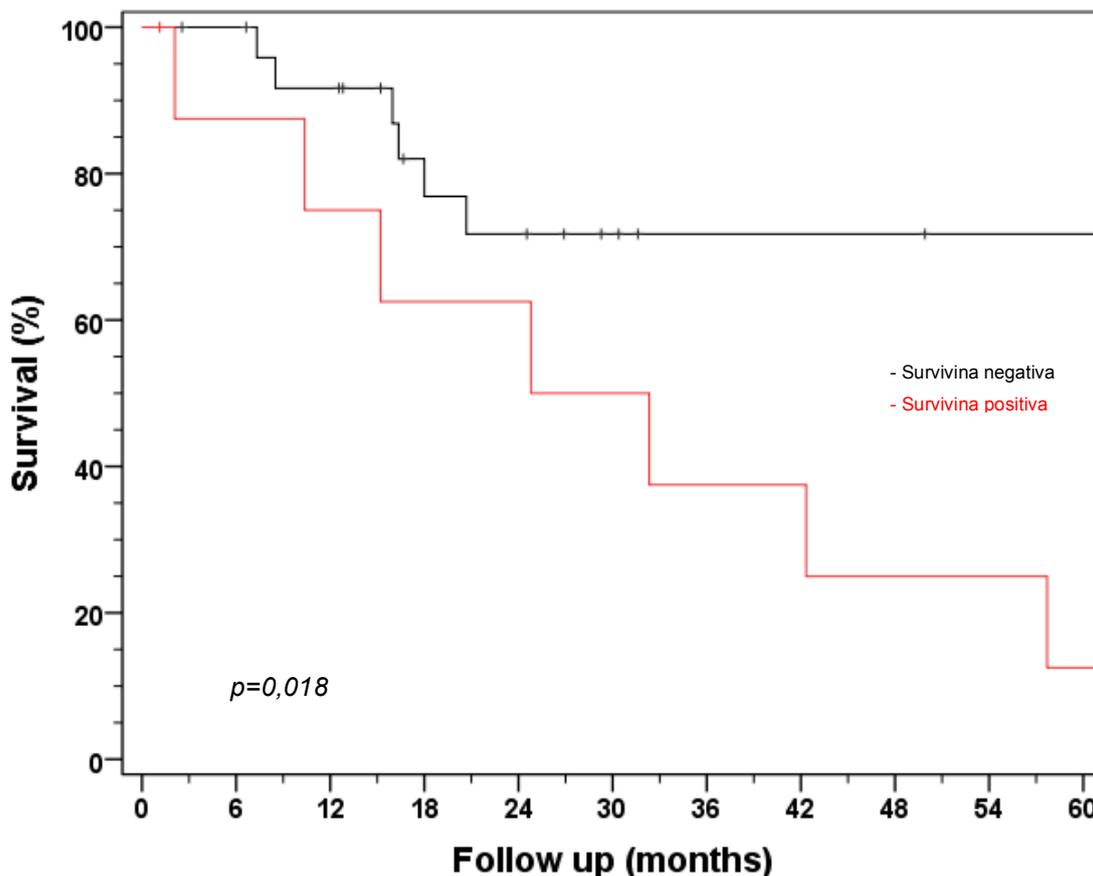
A expressão imuno-histoquímica da survivina foi detectada em nove pacientes (25,7%). Dos pacientes que expressaram survivina, foram predominantes as lesões acometendo glândula 9/9 (100%) e prepúcio 7/9 (77,7%). Quando considerado o grau do tumor nos pacientes com expressão positiva da survivina, 2/9 (22,2%) foram lesões de grau I, 6/9 (66,7%) foram lesões de grau II e 1/9 (11,1%) foram lesões de grau III. Nos pacientes com acometimento linfonodal, a survivina esteve expressa em 4/13 (30,8%). A análise dos dados relacionados à expressão da survivina está resumida na Tabela 2.

**Tabela 2. Características clínico-patológicas de acordo com a expressão da Survivina**

	Survivina – n=26	Survivina + n=9	<i>p</i>
Tamanho, cm			
Mediana	3,2	3,8	0,590
Variação	1,5 – 10,0	2,0 – 16,0	
Subtipo			
Usual	23 (88,5%)	8 (88,9%)	0,732
Verrucoso	3 (11,5%)	1 (11,1%)	
Grau			
I	11 (42,3%)	2 (22,2%)	0,741
II	13 (50,0%)	6 (66,7%)	
III	2(7,7%)	1 (11,1%)	
Estádio Clínico			
Localizado	21 (80,8%)	6 (66,7%)	0,648
Avançado	5 (19,2%)	3 (33,3%)	
Invasão Perineural	6(23,1%)	2 (22,2%)	0,670
Invasão Vascular	4 (15,4%)	1 (11,1%)	0,617
Linfonodo +	9 (34,6%)	4 (44,4%)	0,698
Ki67 ≥ 10	10 (38,5%)	5 (55,6%)	0,451
p16 +	9 (34,6%)	4 (44,4%)	0,540
PD-L1 +	13 (50,0%)	5 (55,6%)	0,540

A mortalidade observada no grupo que expressava survivina foi significativamente superior com um hazard ratio de 3,73 e intervalo de confiança de 95% variando de 1,25 a 11,12 com significância estatística e  $p=0,018$ . Para a sobrevida aos 60 meses, 71,8% dos pacientes survivina negativa estavam vivos, já para os pacientes considerados positivos para expressão da survivina, apenas 12,5% estavam vivos; conforme sumarizado na Figura 10.

Figura 10. Expressão da Survivina X Sobrevida em 60 meses



A expressão imuno-histoquímica do Ki67 para avaliação do índice mitótico foi considerada positiva (Ki67>10%) em 15 pacientes (42,8%). Foram predominantes as lesões acometendo glândula 14/15 (93,3%) e uretra 10/15 (66,6%). Quando considerado o grau do tumor, eram lesões de grau I em 4/15 (26,6%), lesões de grau II em 8/15 (53,3%) e lesões de grau III em 3/15 (20%). Nos pacientes com acometimento linfonodal, o Ki67 foi considerado positivo em 6/13 (46,2%). Houve uma tendência a correlação entre tumores de alta celularidade (expressão de Ki67>10%) apresentarem-se como lesões de maior tamanho (medianas de 4,0cm para Ki67>10% X 2,5cm para Ki67<10% com  $p=0,055$ ). Também houve tendência a tumores de alta celularidade (expressão de Ki67>10%) serem lesões de alto grau (grau II e III 73,3% X 55% grau II para o grupo Ki67<10% com  $p=0,062$ ).

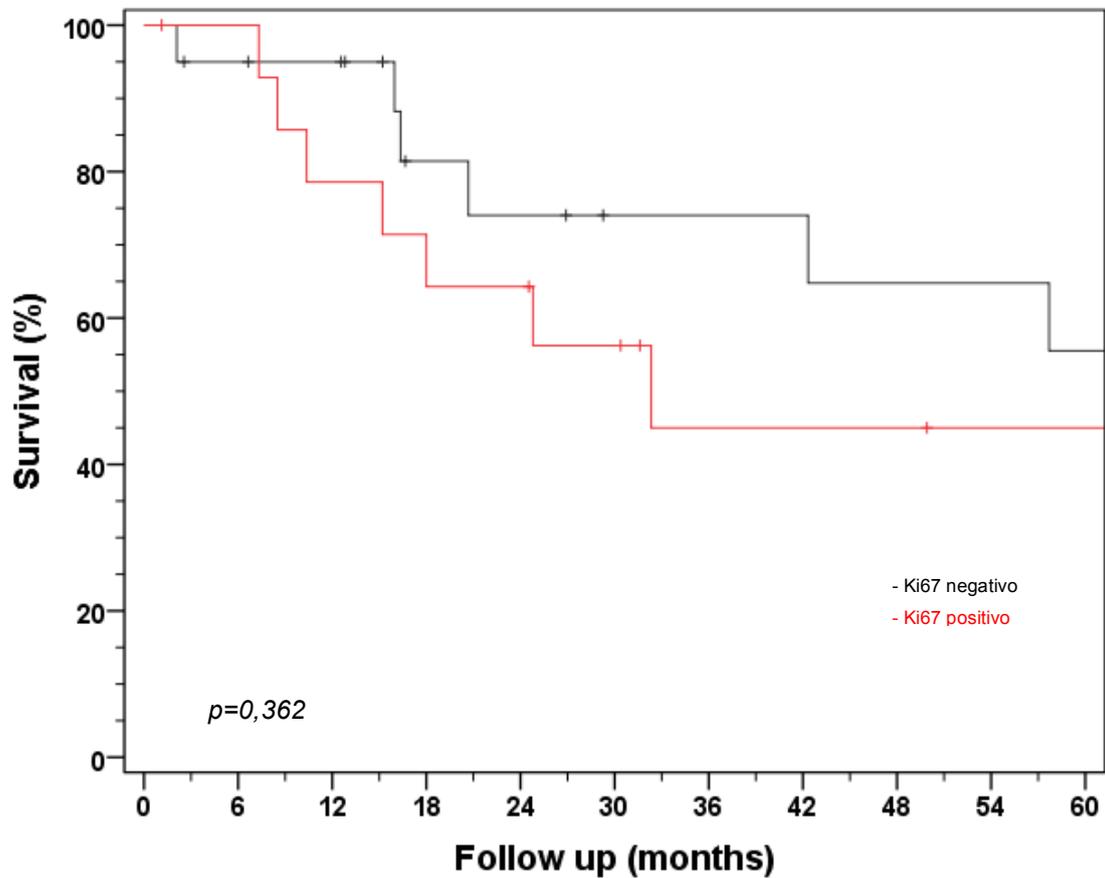
A análise dos dados relacionados à expressão do Ki67 está sumarizada na Tabela 3.

**Tabela 3. Características clínico-patológicas de acordo com a expressão do Ki67**

	Ki67 ≤ 10 n=20	Ki67 ≥ 10 n=15	<i>p</i>
<b>Tamanho, cm</b>			
Mediana	2,55	4,0	0,055
Variação	1,5 – 16,0	1,7 – 10,0	
<b>Subtipo</b>			
Usual	18 (90,0%)	13 (86,7%)	0,581
Verrucoso	2 (10,0%)	2 (13,3%)	
<b>Grau</b>			
I	9 (45,0%)	4 (26,7%)	0,062
II	11 (55,0%)	8 (53,3%)	
III	0	3 (20,0%)	
<b>Estádio Clínico</b>			
Localizado	17 (85,0%)	10 (66,7%)	0,246
Avançado	3 (15,0%)	5 (33,3%)	
Invasão Perineural	3 (15,0%)	5 (33,3%)	0,246
Invasão Vascular	1 (5,0%)	4 (26,7%)	0,141
Linfonodo +	7 (35,0%)	6 (40,0%)	0,518
Survivina +	4 (20,0%)	5 (33,3%)	0,451
p16 +	6 (30,0%)	7 (46,6%)	0,481
PD-L1 +	6 (30,0%)	12 (80,0%)	0,006

Na avaliação da taxa de mortalidade expressa através da sobrevida aos 60 meses não houve significância estatística entre os grupos na análise da expressão do Ki67. Para o grupo considerado positivo, a sobrevida foi de 45% aos 60 meses, já para o grupo considerado negativo, foi de 55%, com hazard ratio de 1,66 e intervalo de confiança de 95% variando de 0,56 a 4,98 para um  $p=0,362$ . Estes dados foram demonstrados na Figura 11.

Figura 11. Expressão do Ki67 X Sobrevida em 60 meses



A expressão imuno-histoquímica do p16 foi considerada positiva em 13 pacientes (37,1%). Foram predominantes as lesões acometendo glândula 13/13 (100%), uretra 9/13 (69,2%) e prepúcio 8/13 (61,5%). Quando considerado o grau do tumor, eram lesões de grau I 3/13 (23,1%), lesões de grau II 8/13 (61,5%) e lesões de grau III 2/13 (15,4%). Nos pacientes com acometimento linfonodal, esteve expressa em 5/13 (38,5%).

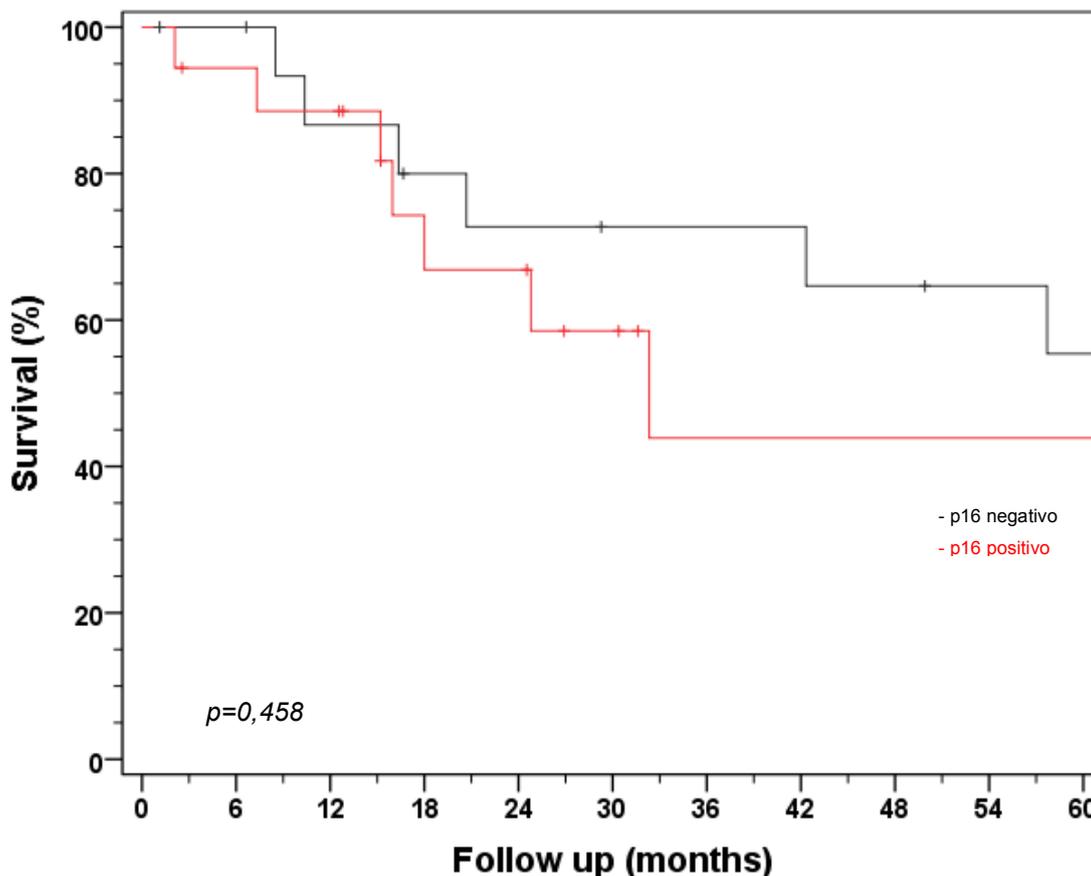
A análise dos dados relacionados à expressão do p16 está resumida na Tabela 4.

**Tabela 4. Características clínico-patológicas de acordo com a expressão do p16**

	<b>p16 - n=22</b>	<b>p16 + n=13</b>	<b>p</b>
<b>Tamanho, cm</b>			
Mediana	3,2	3,5	0,682
Variação	1,5 – 10,0	1,7 – 16,0	
<b>Subtipo</b>			
Usual	19 (86,4%)	12 (92,3%)	0,522
Verrucoso	3 (13,6%)	1 (7,7%)	
<b>Grau</b>			
I	10 (45,5%)	3 (23,1%)	0,297
II	11 (50,0%)	8 (61,5%)	
III	1 (4,5%)	2 (15,4%)	
<b>Estádio Clínico</b>			
Localizado	16 (72,7%)	11 (84,6%)	0,680
Avançado	6 (27,3%)	2 (15,4%)	
Invasão Perineural	4 (18,2%)	4 (30,8%)	0,626
Invasão Vascular	3 (13,6%)	2 (15,4%)	0,626
Linfonodo +	6 (27,2%)	7 (53,8%)	0,552
Survivina +	5 (22,7%)	4 (30,8%)	0,689
Ki67 ≥ 10	8 (36,4%)	7 (53,8%)	0,481
PD-L1 +	8 (36,4%)	10 (76,9%)	0,035

Na avaliação de sobrevida aos 60 meses, não houve significância estatística entre os grupos que expressaram p16 e que não o expressaram. Para o grupo que expressou p16, a sobrevida aos 60 meses foi de 43,9% e para o grupo que não expressou foi de 55,4%. O hazard ratio foi 1,52 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,50 a 4,62 com  $p=0,458$ . Estes dados foram expressados na Figura 12.

Figura 12. Expressão do p16 X Sobrevida em 60 meses



A expressão imuno-histoquímica do PD-L1 foi considerada positiva em 18 pacientes (51,4%). Foi predominante nas lesões acometendo glândula 17/18 (94,4%) e uretra 13/18 (72,2%), seguido por prepúcio e corpo esponjoso ambos com 11/18 (61,1%) dos pacientes. Quando considerado o grau do tumor, eram lesões de grau I em 4/18 (22,2%), lesões de grau II em 11/18 (61,1%) e lesões de grau III em 3/18 (16,6%). Nos pacientes com acometimento linfonodal, esteve expressa em 9/13 (69,2%).

Na análise estatística, os pacientes que expressavam positivamente o PD-L1 apresentaram tumores de maior tamanho, representados através da mediana (4,25cm X 2,6cm) com um  $p=0,027$ . Os CCEP com expressão de PD-L1 foram lesões de maior celularidade, evidenciado pela correlação positiva de PD-L1 com Ki67 > 10% em 80% dos pacientes ( $p=0,006$ ). Houve, ainda, significância estatística nas lesões com positividade de PD-L1 com a expressão de p16 ( $p=0,002$ ).

Nos pacientes com PD-L1 positivo, houve uma tendência a apresentar tumores de alto grau; estes apresentaram lesões grau II e III em 77,8% dos casos, ao passo que apenas 22,2%

possuíam lesões grau I. O PD-L1 foi expresso em todos pacientes com CCEP grau III –  $p=0,061$ .

Não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos PD-L1 e a presença de invasão vascular e invasão perineural, apesar de serem mais prevalentes no grupo PD-L1 positivo. A invasão perineural foi detectada em 33,3% dos PD-L1 positivos e em apenas 11,8% dos PD-L1 negativos ( $p=0,228$ ). A invasão vascular foi detectada em 22,2% dos PD-L1 positivos e em apenas 5,9% dos PD-L1 negativos ( $p=0,338$ ).

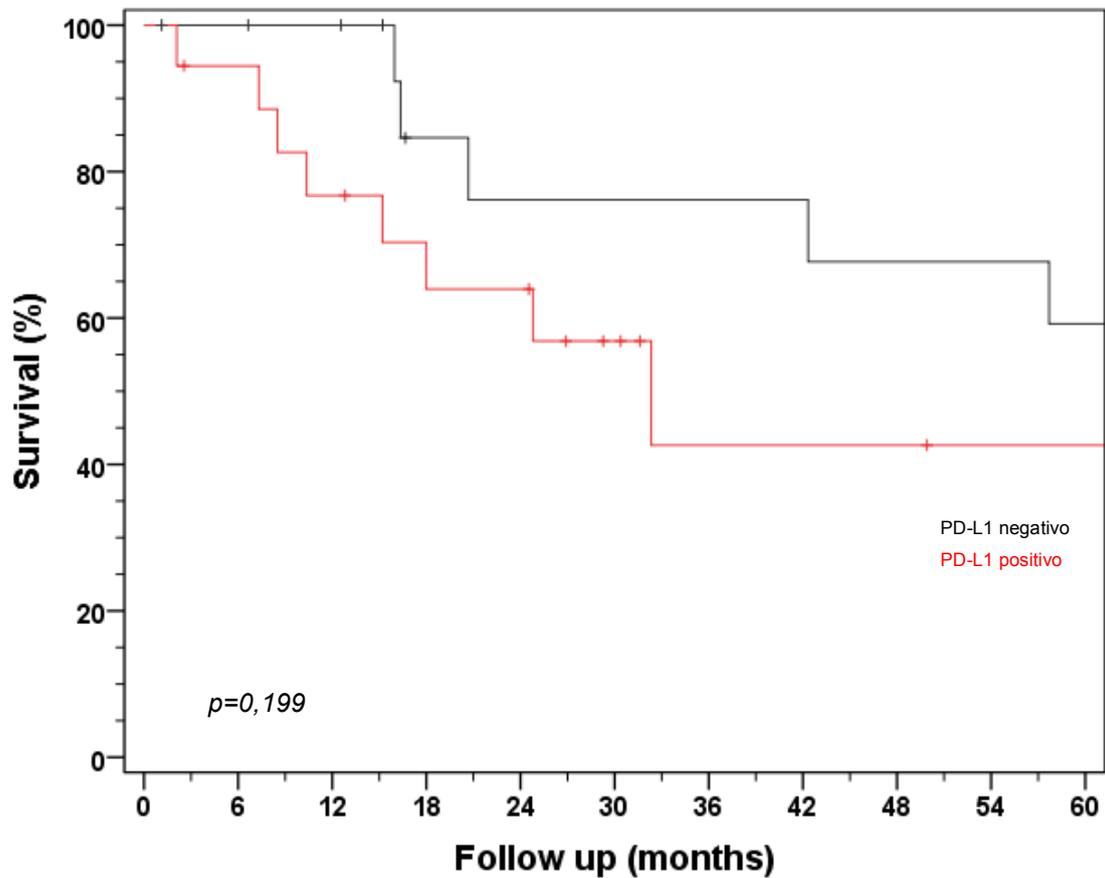
A análise dos dados relacionados à expressão do PD-L1 está sumarizada na Tabela 5.

**Tabela 5. Características clínico-patológicas de acordo com a expressão do PD-L1**

	PD-L1 – n=17	PD-L1 + n=18	<i>p</i>
Tamanho, cm			
Mediana	2,6	4,25	0,027
Variação	1,5 – 5,5	1,7 – 16,0	
Subtipo			
Usual	14 (82,4%)	17 (94,4%)	0,338
Verrucoso	3 (17,6%)	1 (5,6%)	
Grau			
I	9 (52,9%)	4 (22,2%)	0,061
II	8 (47,1%)	11 (61,1%)	
III	0	3 (16,7%)	
Estádio Clínico			
Localizado	14 (82,4%)	13 (72,2%)	0,691
Avançado	3 (17,6%)	3 (16,6%)	
Invasão Perineural	2(11,8%)	6 (33,3%)	0,228
Invasão Vascular	1 (5,9%)	4 (22,2%)	0,338
Linfonodo +	4 (23,5%)	9 (50,0%)	0,164
Ki67 ≥ 10	3 (17,6%)	12 (66,7%)	0,006
p16 +	3 (17,6%)	10 (55,5%)	0,035
Survivina +	4 (23,5%)	5 (27,8%)	0,009

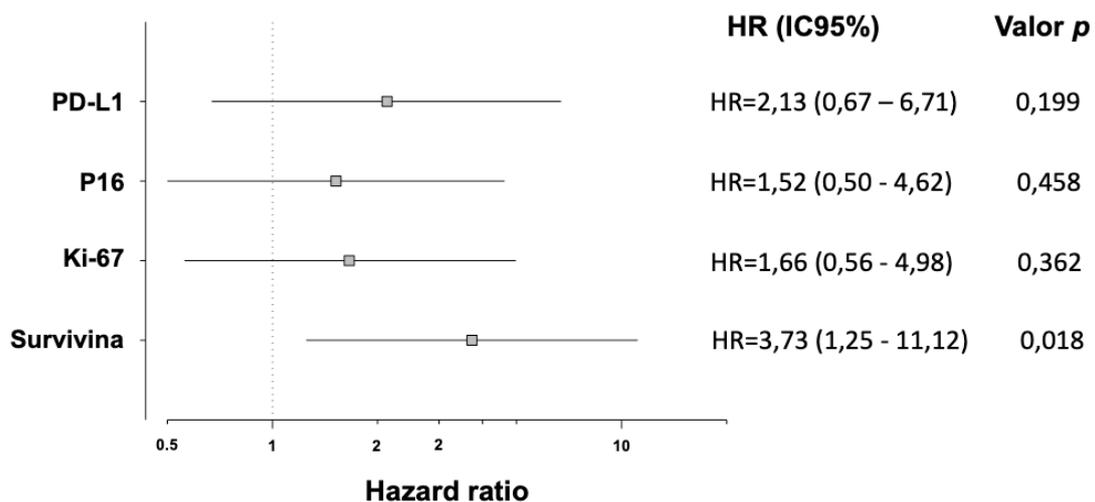
Na avaliação de sobrevida aos 60 meses, não houve significância estatística entre os grupos que expressaram PD-L1 e que não o expressaram. No grupo que expressou PD-L1, a sobrevida aos 60 meses foi de 42,6% e para o grupo que não expressou foi de 59,2%. O hazard ratio foi 2,13 com intervalo de confiança de 95% variando de 0,67 a 7,71 com  $p=0,199$ . Estes dados foram expressados na Figura 13.

Figura 13. Expressão do PD-L1 X Sobrevida em 60 meses



A Figura 14 representa a associação de marcadores tumorais com a ocorrência de óbito em pacientes com CCEP. Os resultados são expressos em *hazard ratios* e seus respectivos intervalos de confiança e significância estatística (*p*) obtidos em modelo de regressão de Cox.

Figura 14. Associação dos marcadores tumorais com a ocorrência de óbito em pacientes com CCEP



## DISCUSSÃO

Este estudo tem como objetivo avaliar potenciais biomarcadores no câncer de pênis. Até o presente momento, nenhum marcador sérico provou ser clinicamente útil no CCEP.

Neste estudo, a survivina foi expressada em cerca de 25% dos pacientes com CCEP. Os pacientes que foram considerados positivos para a expressão de survivina apresentaram lesões maiores quando comparados aos que foram considerados negativos. Para todos os pacientes, independentemente da expressão da survivina, o subtipo usual foi o mais presente. Quando considerado o grau do tumor, as lesões de grau I e II foram predominantes nos pacientes que não expressaram a survivina, ao passo que nos pacientes que tiveram expressão positiva da mesma houve predominância de tumores de alto grau (lesões de grau II). A presença de invasão perineural e de invasão vascular, dois fatores sugestivos de maior agressividade da doença foi semelhante tanto no grupo que expressou a survivina quanto no que não expressou.

Na análise estatística dos dados dos pacientes em relação à survivina, não foram encontradas características clínicas que pudessem ser correlacionadas como fatores de risco isolados para maior agressividade da doença. Entretanto, para os pacientes que expressavam a survivina, a taxa de mortalidade foi significativamente maior, com um hazard ratio de 3,73 (variando de 1,25 a 11,2, intervalo de confiança de 95%) e uma diferença impactante no acompanhamento aos 60 meses conforme demonstrado na Figura 10. Estes achados corroboram os resultados previamente descritos na literatura sobre a expressão da survivina conferir pior prognóstico e sobrevida em outras neoplasias, tal como descrito no trabalho de Lu e colaboradores em câncer de pulmão não pequenas células. (Lu *et al.*, 2004). Assim, embora a survivina seja expressa em apenas  $\frac{1}{4}$  dos pacientes com CCEP, esta parece ser promissora na identificação dos pacientes com pior prognóstico e ser sinalizadora da necessidade de terapias mais agressivas no tratamento do CCEP.

No presente estudo, 37% dos pacientes apresentaram positividade para p16, achados próximos aos encontrados em estudos prévios. (Tang *et al.*, 2015; Zargar-Shoshtari *et al.*, 2016). Nenhuma das variáveis estudadas e consideradas como fatores de risco para pior prognóstico e ou para óbito no CCEP apresentaram significância na análise estatística nas correlações com a expressão do p16. A relação entre HPV, expressão de p16 e o CCEP é bastante variável na literatura e não há dados consistentes correlacionando a positividade do p16 com fatores de risco para agressividade no CCEP. (Bezerra *et al.*, 2015; Steinestel *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015).

Em relação ao Ki67, houve uma tendência a apresentar lesões maiores nos pacientes que tiveram expressão positiva (Ki67>10%) com tamanho mediano de 4,0cm. Já nos paciente com Ki67<10% o tamanho mediano da lesão foi de 2,55cm, com um  $p=0,055$ . Ainda, observou-se que a positividade na expressão do Ki67 esteve mais relacionada com lesões de grau II e grau III (73,3% dos pacientes com Ki67>10%) ao passo que para os pacientes com expressão de Ki67<10% (considerada negativa) 45% apresentavam lesões de grau I e 55% lesões de grau II, com  $p=0,062$ . Tais achados, embora sem apresentar significância estatística, corroboram com alguns estudos previamente descritos na literatura. (Berdjjs *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007).

Neste estudo, cerca de 50% dos CCEP foram PD-L1 positivos, o que está de acordo com os achados prévios da literatura. (Udager *et al.*, 2016). Os CCEP que apresentaram positividade para PD-L1 foram predominantemente lesões do subtipo usual. Estes tumores PD-L1 positivos apresentaram significância estatística com fatores de risco para doença de maior agressividade clínico-patológica, sendo tumores maiores do que os CCEP PD-L1 negativos e com maior celularidade. Os CCEP com positividade de PD-L1 tiveram correlação estatística com a expressão de p16 e este esteve presente em cerca de 55% dos PD-L1 positivos, o que sugere haver uma relação com a presença de HPV. Estes achados correlacionando PD-L1 e p16 encontram-se em discordância com estudo previamente publicado por Ottenhof e colaboradores. (Ottenhof *et al.*, 2017). Na amostra deste estudo, houve uma tendência a expressão de PD-L1 estar associada a tumores de alto grau, sem entretanto apresentar significância estatística. Também não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos PD-L1 e a presença de invasão vascular e invasão perineural, entretanto ambas estiveram mais frequentes no grupo que expressou PD-L1. Embora não tenha atingido significância estatística, houve uma relação maior que duas vezes no acometimento linfonodal dos pacientes que expressavam PD-L1 (69,2% dos pacientes com acometimento dos linfonodos possuíam PD-L1 positivo e apenas 30,8% apresentaram linfonodos acometidos com PD-L1 negativo). Também não houve significância estatística na análise da sobrevida em 60 meses dos pacientes com expressão de PD-L1.

Conforme resultados de estudos anteriores na avaliação da resposta à terapia imune com anti-PD-L1 em diferentes tumores, os quais sugerem que a positividade na expressão de PD-L1 pelas células tumorais pode estar relacionada a maiores taxas de resposta ao tratamento, (Borghaei *et al.*, 2015; Brahmer *et al.*, 2015; Motzer *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2015) parece haver uma possibilidade de uma parcela dos CCEP serem suscetíveis a terapias imunes envolvendo anti-PD-L1.

## **LIMITAÇÕES**

Este estudo apresenta limitações inerentes a um estudo retrospectivo no que tange a seleção dos pacientes e obtenção de todos os dados das variáveis pesquisadas. Apresenta ainda tamanho limitado da amostra devido à raridade da condição estudada em nosso meio. Ainda, a análise de IHQ foi realizada em blocos de parafina, o que pode, eventualmente, impactar na análise de alguns biomarcadores.

Diversas variáveis na avaliação IHQ podem interferir diretamente nos resultados encontrados, tais como o uso de diferentes pontos de corte para considerar as leituras das lâminas como positivas ou negativas, uso de diferentes anti-corpos, a variação inter-examinador na análise das lâminas.

## CONCLUSÃO

De acordo com os achados no presente estudo, a survivina parece ser um potencial biomarcador para agressividade no CCEP visto que esteve associada a maior taxa de mortalidade. Assim, a expressão imuno-histoquímica positiva para survivina nos pacientes com CCEP pode justificar o emprego de tratamentos mais agressivos na apresentação inicial da doença e, ainda, ajudar na seleção dos pacientes candidatos realização de linfadenectomias.

Os achados em relação à expressão de PD-L1 no CCEP permitem sugerir que há uma tendência a maior agressividade nos pacientes com CCEP com PD-L1 positivo. Entretanto, não houve uma associação direta com maior taxa de mortalidade nestes pacientes. Sabe-se que a positividade na expressão de PD-L1 pelas células tumorais pode estar relacionada a maiores taxas de resposta à terapia imune com anti-PD-L1. Como existe expressão de PD-L1 no CCEP, parece haver uma possibilidade de uma parcela dos CCEP ser suscetível a terapias imunes envolvendo anti-PD-L1. Assim, tais achados fornecem dados clínicos para realização de novos e maiores estudos para avaliação de terapias imunes anti-PD-L1 no tratamento do CCEP.

## REFERÊNCIAS:

ADIDA, C. et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. **Am J Pathol**, v. 152, n. 1, p. 43-9, Jan 1998. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422522> >.

ALTIERI, D. C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. **Trends Mol Med**, v. 7, n. 12, p. 542-7, Dec 2001. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733216> >.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, v. 3, n. 8, p. 917-21, Aug 1997. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9256286> >.

BACKES, D. M. et al. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes Control**, v. 20, n. 4, p. 449-57, May 2009. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082746> >.

BADRAN, A. et al. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 314, n. 3, p. 902-7, Feb 2004. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741722> >.

BARRETO, J. E. et al. Carcinoma cuniculatum: a distinctive variant of penile squamous cell carcinoma: report of 7 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 31, n. 1, p. 71-5, Jan 2007. ISSN 0147-5185. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17197921> >.

BERDJIS, N. et al. Expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. **BJU Int**, v. 96, n. 1, p. 146-8, Jul 2005. ISSN 1464-4096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963138> >.

BEZERRA, S. M. et al. Human papillomavirus infection and immunohistochemical p16(INK4a) expression as predictors of outcome in penile squamous cell carcinomas. **Hum Pathol**, v. 46, n. 4, p. 532-40, Apr 2015. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25661481> >.

BLEEKER, M. C. et al. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol**, v. 27, n. 2, p. 141-50, Apr 2009. ISSN 1433-8726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607597> >.

BORGHAEI, H. et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, v. 373, n. 17, p. 1627-39, Oct 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412456> >.

BRAHMER, J. et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, v. 373, n. 2, p. 123-35, Jul 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26028407> >.

BRODERS, A. C. SQUAMOUS-CELL EPITHELIOMA OF THE SKIN: A STUDY OF 256 CASES. **Ann Surg**, v. 73, n. 2, p. 141-60, Feb 1921. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17864409> >.

BUECHNER, S. A. Common skin disorders of the penis. **BJU Int**, v. 90, n. 5, p. 498-506, Sep 2002. ISSN 1464-4096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175386> >.

BYUN, S. S. et al. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. **Urology**, v. 69, n. 1, p. 34-7, Jan 2007. ISSN 1527-9995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270609> >.

CABANAS, R. M. Anatomy and biopsy of sentinel lymph nodes. **Urol Clin North Am**, v. 19, n. 2, p. 267-76, May 1992. ISSN 0094-0143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574817> >.

CALDAS, H. et al. Dissecting the role of endothelial SURVIVIN DeltaEx3 in angiogenesis. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1479-89, Feb 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038538> >.

CATALONA, W. J. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the penis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. **J Urol**, v. 140, n. 2, p. 306-10, Aug 1988. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3398125> >.

CHAUX, A. et al. Epidemiologic profile, sexual history, pathologic features, and human papillomavirus status of 103 patients with penile carcinoma. **World J Urol**, v. 31, n. 4, p. 861-7, Aug 2013. ISSN 1433-8726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116602> >.

\_\_\_\_\_. Comparison of morphologic features and outcome of resected recurrent and nonrecurrent squamous cell carcinoma of the penis: a study of 81 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 33, n. 9, p. 1299-306, Sep 2009. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471153> >.

COHEN, C. et al. Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis. **Mod Pathol**, v. 16, n. 6, p. 574-83, Jun 2003. ISSN 0893-3952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808063> >.

CROOK, J.; MA, C.; GRIMARD, L. Radiation therapy in the management of the primary penile tumor: an update. **World J Urol**, v. 27, n. 2, p. 189-96, Apr 2009. ISSN 1433-8726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636264> >.

CUBILLA, A. L. et al. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. A prospective study of 66 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 17, n. 8, p. 753-63, Aug 1993. ISSN 0147-5185. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8338190> >.

\_\_\_\_\_. The basaloid cell is the best tissue marker for human papillomavirus in invasive penile squamous cell carcinoma: a study of 202 cases from Paraguay. **Am J Surg Pathol**, v.

34, n. 1, p. 104-14, Jan 2010. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035150> >.

\_\_\_\_\_. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. **Int J Surg Pathol**, v. 9, n. 2, p. 111-20, Apr 2001. ISSN 1066-8969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11484498> >.

DALING, J. R. et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. **Int J Cancer**, v. 116, n. 4, p. 606-16, Sep 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15825185> >.

DE CREVOISIER, R. et al. Long-term results of brachytherapy for carcinoma of the penis confined to the glans (N- or NX). **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 74, n. 4, p. 1150-6, Jul 2009. ISSN 1879-355X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19395183> >.

DENG, C. et al. Tumor PD-L1 expression is correlated with increased TILs and poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 2, p. e1269047, 2017. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28344882> >.

DUFFY, M. J. et al. Survivin: a promising tumor biomarker. **Cancer Lett**, v. 249, n. 1, p. 49-60, Apr 2007. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275177> >.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007. ISSN 0192-6233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483> >.

FLAHERTY, A. et al. Implications for human papillomavirus in penile cancer. **Urol Oncol**, v. 32, n. 1, p. 53.e1-8, Jan 2014. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239463> >.

FUKUDA, S.; PELUS, L. M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 5, p. 1087-98, May 2006. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731740> >.

GIANNATEMPO, P. **Survival analyses of adjuvant or neoadjuvant combination of a taxane plus cisplatin and 5-fluorouracil (T-PF) in patients with bulky nodal metastases from squamous cell carcinoma of the penis (PSCC): Results of a single high-volume center.** PAGANONI, A.;SANGALLI, L., *et al.* *J Clin Oncol.* 32: 5 2014.

GONZAGA-SILVA, L. F. et al. [Brazilian Society of Urology. Guidelines on penile neoplasm]. **Int Braz J Urol**, v. 33 Suppl 1, p. 55-75, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 1677-5538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638468> >.

GOTSADZE, D. et al. Is conservative organ-sparing treatment of penile carcinoma justified? **Eur Urol**, v. 38, n. 3, p. 306-12, Sep 2000. ISSN 0302-2838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940705> >.

GRAAFLAND, N. M. et al. Inguinal recurrence following therapeutic lymphadenectomy for node positive penile carcinoma: outcome and implications for management. **J Urol**, v. 185, n. 3, p. 888-93, Mar 2011. ISSN 1527-3792. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239009> >.

GRABOWSKI, P. et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 88, n. 1, p. 115-9, Jan 2003. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556969> >.

GUIMARÃES, G. C. et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol**, v. 182, n. 2, p. 528-34; discussion 534, Aug 2009. ISSN 1527-3792. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524964> >.

\_\_\_\_\_. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology**, v. 70, n. 1, p. 137-42, Jul 2007. ISSN 1527-9995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656224> >.

HAKENBERG, O. W. et al. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. **Eur Urol**, v. 67, n. 1, p. 142-50, Jan 2015. ISSN 1873-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25457021> >.

\_\_\_\_\_. Cisplatin, methotrexate and bleomycin for treating advanced penile carcinoma. **BJU Int**, v. 98, n. 6, p. 1225-7, Dec 2006. ISSN 1464-4096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17125480> >.

HEYNS, C. F.; MENDOZA-VALDÉS, A.; POMPEO, A. C. Diagnosis and staging of penile cancer. **Urology**, v. 76, n. 2 Suppl 1, p. S15-23, Aug 2010. ISSN 1527-9995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691881> >.

HORENBLAS, S. et al. Squamous cell carcinoma of the penis: accuracy of tumor, nodes and metastasis classification system, and role of lymphangiography, computerized tomography scan and fine needle aspiration cytology. **J Urol**, v. 146, n. 5, p. 1279-83, Nov 1991. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1942279> >.

HUANG, Y. et al. Expression and prognostic significance of survivin splice variants in diffusely infiltrating astrocytoma. **J Clin Pathol**, v. 64, n. 11, p. 953-9, Nov 2011. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21730264> >.

IKEGUCHI, M. et al. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. **Diagn Mol Pathol**, v. 11, n. 1, p. 33-40, Mar 2002. ISSN 1052-9551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854600> >.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 677-704, 2008. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173375> >.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027> >.

KNUTSEN, A.; ADELL, G.; SUN, X. F. Survivin expression is an independent prognostic factor in rectal cancer patients with and without preoperative radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 60, n. 1, p. 149-55, Sep 2004. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337550> >.

KREIMER, A. R. et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 2, p. 467-75, Feb 2005. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734974> >.

KROON, B. K. et al. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. **J Urol**, v. 173, n. 3, p. 816-9, Mar 2005. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15711276> >.

KU, J. H. et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. **J Urol**, v. 171, n. 2 Pt 1, p. 631-5, Feb 2004. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14713775> >.

KULKARNI, J. N.; KAMAT, M. R. Prophylactic bilateral groin node dissection versus prophylactic radiotherapy and surveillance in patients with N0 and N1-2A carcinoma of the penis. **Eur Urol**, v. 26, n. 2, p. 123-8, 1994. ISSN 0302-2838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957466> >.

LI, Y. H. et al. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 13, p. 1984-8, Jul 2004. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15222052> >.

LONT, A. P. et al. A comparison of physical examination and imaging in determining the extent of primary penile carcinoma. **BJU Int**, v. 91, n. 6, p. 493-5, Apr 2003. ISSN 1464-4096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12656901> >.

LU, B. et al. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, v. 91, n. 3, p. 537-40, Aug 2004. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15266313> >.

MAICHE, A. G.; PYRHÖNEN, S.; KARKINEN, M. Histological grading of squamous cell carcinoma of the penis: a new scoring system. **Br J Urol**, v. 67, n. 5, p. 522-6, May 1991. ISSN 0007-1331. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710163> >.

MARGULIS, V.; LOTAN, Y.; SHARIAT, S. F. Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer. **World J Urol**, v. 26, n. 1, p. 59-65, Feb 2008. ISSN 0724-4983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962949> >.

MARSONI, S.; DAMIA, G. Molecular targeting: new therapeutic strategies to improve tumour apoptosis. **Ann Oncol**, v. 15 Suppl 4, p. iv229-31, 2004. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15477312> >.

MENTRIKOSKI, M. J. et al. Histologic and immunohistochemical assessment of penile carcinomas in a North American population. **Am J Surg Pathol**, v. 38, n. 10, p. 1340-8, Oct 2014. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210933> >.

MOHS, F. E. et al. Microscopically controlled surgery in the treatment of carcinoma of the penis. **J Urol**, v. 133, n. 6, p. 961-6, Jun 1985. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3999220> >.

MOTZER, R. J. et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. **N Engl J Med**, v. 373, n. 19, p. 1803-13, Nov 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26406148> >.

O'BRIEN, J. S. et al. Penile Cancer: Contemporary Lymph Node Management. **J Urol**, v. 197, n. 6, p. 1387-1395, Jun 2017. ISSN 1527-3792. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115191> >.

ORNELLAS, A. A. et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. **J Urol**, v. 151, n. 5, p. 1244-9, May 1994. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512656> >.

OSHITA, F. et al. Prognostic impact of survivin, cyclin D1, integrin beta1, and VEGF in patients with small adenocarcinoma of stage I lung cancer. **Am J Clin Oncol**, v. 27, n. 4, p. 425-8, Aug 2004. ISSN 1537-453X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289739> >.

OTTENHOF, S. R. et al. Expression of Programmed Death Ligand 1 in Penile Cancer is of Prognostic Value and Associated with HPV Status. **J Urol**, v. 197, n. 3 Pt 1, p. 690-697, Mar 2017. ISSN 1527-3792. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27697578> >.

PENNATI, M.; FOLINI, M.; ZAFFARONI, N. Targeting survivin in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets**, v. 12, n. 4, p. 463-76, Apr 2008. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348682> >.

PETTAWAY, C. A. et al. Treatment of visceral, unresectable, or bulky/unresectable regional metastases of penile cancer. **Urology**, v. 76, n. 2 Suppl 1, p. S58-65, Aug 2010. ISSN 1527-9995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691886> >.

PFISTER, H.; HANEKE, E. Demonstration of human papilloma virus type 2 DNA in Bowen's disease. **Arch Dermatol Res**, v. 276, n. 2, p. 123-5, 1984. ISSN 0340-3696. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6326696> >.

PHAM, M. N. et al. Contemporary survival trends in penile cancer: Results from the National Cancer Database. **Urol Oncol**, Sep 2017. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28882672> >.

PIZZOCARO, G. et al. EAU penile cancer guidelines 2009. **Eur Urol**, v. 57, n. 6, p. 1002-12, Jun 2010. ISSN 1873-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163910> >.

POND, G. R. et al. Prognostic risk stratification derived from individual patient level data for men with advanced penile squamous cell carcinoma receiving first-line systemic therapy. **Urol Oncol**, v. 32, n. 4, p. 501-8, May 2014. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332646> >.

QIN, Q. et al. Association between survivin -31G>C polymorphism and cancer risk: meta-analysis of 29 studies. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 140, n. 2, p. 179-88, Feb 2014. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077840> >.

RABINOVICH, G. A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 267-96, 2007. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17134371> >.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 11, p. 897-907, Nov 2004. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520809> >.

RIPPENTROP, J. M.; JOSLYN, S. A.; KONETY, B. R. Squamous cell carcinoma of the penis: evaluation of data from the surveillance, epidemiology, and end results program. **Cancer**, v. 101, n. 6, p. 1357-63, Sep 2004. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15316902> >.

ROBERT, C. et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. **N Engl J Med**, v. 372, n. 4, p. 320-30, Jan 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399552> >.

ROMERO, F. R. et al. Adenosquamous carcinoma of the penis. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 61, n. 4, p. 363-4, Aug 2006. ISSN 1807-5932. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924331> >.

ROSATO, A. et al. Survivin expression impacts prognostically on NSCLC but not SCLC. **Lung Cancer**, v. 79, n. 2, p. 180-6, Feb 2013. ISSN 1872-8332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23218791> >.

SAISORN, I. et al. Fine-needle aspiration cytology predicts inguinal lymph node metastasis without antibiotic pretreatment in penile carcinoma. **BJU Int**, v. 97, n. 6, p. 1225-8, Jun 2006. ISSN 1464-4096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16686716> >.

SARELA, A. I. et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. **Br J Cancer**, v. 86, n. 6, p. 886-92, Mar 2002. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953819> >.

SCHNEIDER, V. Microscopic diagnosis of HPV infection. **Clin Obstet Gynecol**, v. 32, n. 1, p. 148-56, Mar 1989. ISSN 0009-9201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2544334> >.

SCHOEN, E. J. et al. The highly protective effect of newborn circumcision against invasive penile cancer. **Pediatrics**, v. 105, n. 3, p. E36, Mar 2000. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699138> >.

SOTELO, R. et al. Endoscopic lymphadenectomy for penile carcinoma. **J Endourol**, v. 21, n. 4, p. 364-7; discussion 367, Apr 2007. ISSN 0892-7790. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451323> >.

STANKIEWICZ, E. et al. The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol**, v. 65, n. 6, p. 534-7, Jun 2012. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447920> >.

STEINESTEL, J. et al. The role of histologic subtype, p16(INK4a) expression, and presence of human papillomavirus DNA in penile squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 15, p. 220, Apr 2015. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885064> >.

TANAKA, K. et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 1, p. 127-34, Jan 2000. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656440> >.

TANG, D. H. et al. Lack of P16ink4a over expression in penile squamous cell carcinoma is associated with recurrence after lymph node dissection. **J Urol**, v. 193, n. 2, p. 519-25, Feb 2015. ISSN 1527-3792. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261804> >.

TOBIAS-MACHADO, M. et al. Video endoscopic inguinal lymphadenectomy: a new minimally invasive procedure for radical management of inguinal nodes in patients with penile squamous cell carcinoma. **J Urol**, v. 177, n. 3, p. 953-7; discussion 958, Mar 2007. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296386> >.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **N Engl J Med**, v. 366, n. 26, p. 2443-54, Jun 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658127> >.

UDAGER, A. M. et al. Frequent PD-L1 expression in primary and metastatic penile squamous cell carcinoma: potential opportunities for immunotherapeutic approaches. **Ann Oncol**, v. 27, n. 9, p. 1706-12, 09 2016. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27217541> >.

VELAZQUEZ, E. F. et al. Sarcomatoid carcinoma of the penis: a clinicopathologic study of 15 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 9, p. 1152-8, Sep 2005. ISSN 0147-5185. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096403> >.

VENTIMIGLIA, E. et al. Human Papillomavirus Infection and Vaccination in Males. **Eur Urol Focus**, v. 2, n. 4, p. 355-362, Oct 2016. ISSN 2405-4569. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28723467> >.

WEBER, J. S. et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 4, p. 375-84, Apr 2015. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795410> >.

WEIKERT, S. et al. The inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is expressed in human testicular germ cell tumors and normal testes. **Cancer Lett**, v. 223, n. 2, p. 331-7, Jun 2005. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896468> >.

XU, L.; ZHOU, X.; YIN, R. Survivin rs9904341 (G>C) polymorphism contributes to cancer risk: an updated meta-analysis of 26 studies. **Tumour Biol**, v. 35, n. 2, p. 1661-9, Feb 2014. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096544> >.

YU, J. et al. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. **Br J Cancer**, v. 87, n. 1, p. 91-7, Jul 2002. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085263> >.

ZARGAR-SHOSHTARI, K. et al. Clinical Significance of p53 and p16(ink4a) Status in a Contemporary North American Penile Carcinoma Cohort. **Clin Genitourin Cancer**, v. 14, n. 4, p. 346-51, 08 2016. ISSN 1938-0682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26794389> >.

ZHU, Y. et al. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. **BJU Int**, v. 100, n. 1, p. 204-8, Jul 2007. ISSN 1464-4096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433031> >.

ZOUHAIR, A. et al. Radiation therapy alone or combined surgery and radiation therapy in squamous-cell carcinoma of the penis? **Eur J Cancer**, v. 37, n. 2, p. 198-203, Jan 2001. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166146> >.

# ANEXOS

## Termo de compromisso para utilização de dados:



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS

#### Título do Projeto/Relato de Caso

"ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA SURVIVINA NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE PÊNIS"

Os autores do projeto de pesquisa/relato de caso se comprometem a manter o sigilo dos dados coletados em prontuários e/ou em bases de dados referentes aos participantes da pesquisa intitulada "ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA SURVIVINA NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE PÊNIS". Os pesquisadores concordam, igualmente, que tais informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos participantes.

Porto Alegre, 10 de SETEMBRO de 20 15

Autores do Projeto/ Relato de Caso	
Nome	Assinatura
MATEUS WEDDER DE BACCO	
GUSTAVO FRANCO CARVALHAL	
VINÍCIUS DUVAL DA SILVA	

## Aprovação CEP/SIPESQ



**SIPESQ**  
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6945

Porto Alegre, 16 de novembro de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA SURVIVINA NO CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE PÊNIS" coordenado por GUSTAVO FRANCO CARVALHAL. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA

---

## Artigo Científico

### PD-L1 and p16 Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma from an Endemic Region

Mateus W. De Bacco<sup>a</sup>, Gustavo F. Carvalhal<sup>a,b</sup>, , Bradley MacGregor<sup>c</sup>, Josenel M. B. Marçal<sup>a</sup>, Mario B. Wagner<sup>a</sup>, Guru P. Sonpavde<sup>c</sup>, André P. Fay<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup>PUCRS School of Medicine, Porto Alegre, Brazil;

<sup>b</sup>Department of Urology - Hospital Sao Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil;

<sup>c</sup>Dana Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, Boston, USA;

<sup>d</sup>Department of Medical Oncology - Hospital Sao Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author: André P. Fay, MD, PhD. PUCRS School of Medicine, Av. Ipiranga 6690 – Building 60 (HSL) - 3<sup>rd</sup> Floor, 302, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil. Phone: +55 51 33203015. Email: andre.fay@pucrs.br; Andre\_Fay@dfci.harvard.edu

Keywords: p16, HPV, PD-L1, penile cancer, immunotherapy

## **Abstract**

**Background:** Penile squamous cell carcinoma (PSCC) is a rare urological malignancy with higher incidence in developing countries. Treatment options include surgery, radiation therapy, and systemic chemotherapy. However, effective treatments for advanced disease are lacking. To understand the biology underlying PSCC from endemic regions may help the development of new therapeutic strategies.

**Objectives:** To evaluate immunohistochemical expression of PD-L1 and p16 in PSCC and its association with clinico-pathological features and outcome.

**Design, setting and participants:** A cohort of 40 patients with PSCC from an academic institution in Brazil was analyzed. Clinico-pathological features and outcomes were retrospectively collected. PD-L1 and p16 immunohistochemical expression were performed in FFPE from PSCC. PD-L1 was considered positive with any staining in more than 1% of tumor and p16 was defined as positive with any staining in more than 10%.

**Outcomes measurements and statistical analysis:** Associations were performed using Mann-Whitney U test and Fisher's exact test. Kaplan-Meier curves were used to estimate survival rates with log-rank

**Results and limitations:** Forty patients undergoing partial or total penectomy were selected. Five were excluded, 4 due to lack of data and 1 no tumor available. Out of 35, 18 (51.4%) were considered PD-L1 positive (PD-L1+). PD-L1+ were associated with larger tumors, ( $p=0.027$ ). There was an association between PD-L1+ and p16 expression ( $p=0.002$ ). PD-L1+ was more frequent in grade II and III than grade I

(77.8% vs. 22.2%) and PD-L1 was expressed in all patients with grade III. Lymph node involvement was associated with PD-L1 expression (69.2% PD-L1+ vs. 30.8% PD-L1-). 5-year mortality was 37.1%. Mean follow-up was 46.87 months.

**Conclusion:** PD-L1 expression appears to be associated with p16 expression, larger tumors and worse clinical outcomes in PSCC from an endemic region.

**Patient summary:** PD-L1 and p16 expression relationship with risk factors and 5-year survival was analyzed in PSCC. PD-L1+ is associated with worse outcomes and may provide clinical data for new studies to evaluate anti-PD-L1 immune therapies

## INTRODUCTION

Penile squamous cell carcinoma (PSCC) is a rare and aggressive malignancy, which carries a major psychological impact.<sup>1</sup> In United States, 2,080 men were diagnosed with PSCC in the year of 2018, representing less than 0.4% of male malignancies, and 410 patients died from the disease. In contrast, PSCC is relatively common in developing countries affecting low income, and non-circumcised males.<sup>2</sup> In Brazil, this tumor represents 2% of all men's cancer and are more frequent in the North and Northeast regions.<sup>3</sup> In this endemic areas two thirds of patients are diagnosed with advanced disease (T2 or higher) resulting in a higher risk of local or systemic metastasis.

Worldwide, PSCC has a recurrence rate of about 29% and lymph node metastases are found in 28-39% depending upon the extent and grade of the tumor.<sup>3</sup> In a large series, stage I cases have an estimated 10-year survival of 89%.<sup>4</sup> In contrast, only 21% of metastatic PSCC are alive at 2-years.<sup>4: 5</sup> Effective therapeutic options for advanced penile cancers are lacking, partially due to the poor

understanding of the biology and genomic alterations that underlie the tumor development and progression.

Human papilloma virus (HPV) infection has been associated with the development of penile cancer in approximately 30-80% of the cases. Subtypes 6 and 11 are most often related to genital warts with low dysplasia. Subtypes 16, 18, 31 and 33 are associated with in situ carcinoma or invasive disease, with 16 being the most prevalent subtype and also detected in metastases of penile carcinoma.<sup>6</sup> p16 overexpression has been widely used as a surrogate marker for HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma and uterine cervical cancers and penile cancers.<sup>7; 8</sup> The role of HPV infection as a prognostic factor in penile cancer remains unclear in developing countries.<sup>9</sup>

PD-1 is a co-inhibitory receptor present on CD8-positive cytotoxic T cells and interacts with its ligand PD-L1 on tumor cell membranes resulting in suppression of T-cell activation and proliferation, and thereby, dampening of the host anti-tumor immune response.<sup>10</sup> Inhibiting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway should augment tumor cell killing by cytotoxic T cells.

Several studies have shown that PD-L1 positive expression is associated with adverse clinic-pathological features and worse outcome in other malignancies, like renal-cell carcinoma and bladder cancer.<sup>11;12</sup> Furthermore, PD-L1 expression may be a biomarker to predict oncological outcome and treatment response.<sup>13; 14</sup>

In this study, we sought to characterize the immunohistochemical (IHC) expression of PD-L1 and p16 in PSCC from an endemic region and evaluate its association with clinico-pathological features and outcome.

## **PATIENTS AND METHODS**

A cohort of 40 patients who performed partial or total penectomy between 1998 and 2016 at São Lucas Hospital of PUCRS were retrospectively selected. This is an academic hospital in the south of Brazil which is a referral center for PSCC treatment. Five out of 40 patients were excluded from the study, 4 due to lack of clinical data and 1 no tumor specimens were available.

Patients' medical records were retrospectively reviewed using standard templates. Clinico-pathological characteristics, such as age, size, histological subtype, presence of lymph node invasion, inguinal lymphadenectomy surgery, pathological staging, surgical margins, vascular invasion, perineural invasion and postoperative follow-up, including death were retrieved. Clinical outcome were also collected. Five-year survival was defined as date from diagnosis until 60 months after it. To define survival rate, patients who did not have updated records of consultations at the institution were contacted by telephone for health information and/or date of death. The last follow up information was obtained in October 2017.

## **IMMUNOHISTOCHEMISTRY**

Formalin-fixed paraffin embedded (FFPB) were obtained from the Pathology department. Specimens were analyzed by the HSL/PUCRS Pathology Department. Slides from a representative area of the tumor was prepared and the immunohistochemical analysis for PD-L1 and p16 was performed.

PD-L1 expression was retrospectively evaluated by IHC using the monoclonal anti-PD-L1 (clone ZR3, zeta-corporation) on the DAKO autostainer sistem. The IHC expression of PD-L1 was evaluated by percentage of membrane and/or cytoplasm stained and was considered positive with any staining in more than 1% of tumor cell membrane.

Immunohistochemistry for p16 was also performed using the DAKO autostainer system using anti-p16 (clone G75-405, zeta-corporation). Expression for p16 was defined as negative if positivity was lower than 10%.

## **STATISTICAL ANALYSIS**

Quantitative data were described by median and minimum and maximum values. Categorical data were presented by counts and percentages. Comparisons between quantitative data were performed by the Mann-Whitney U test and categorical data by Fisher's exact test. Additionally, Kaplan-Meier curves were obtained to estimate the survival rates with statistical significance by the log-rank test. Association strength measures based on the hazard ratio and their respective confidence intervals were estimated using Cox proportional hazards regression. The level of significance adopted in the study was  $\alpha=0.05$ . Data was processed and analyzed with IBM-SPSS software version 22.0.

## **RESULTS**

### **PATIENT CHARACTERISTICS**

Patient characteristics are summarized in Table 1. Briefly, mean age was 64.6 years with 12.4 years of standard deviation (SD). Mean size of the primary lesions was 4.0cm, ranging from 1.5 to 16cm. Of the 35 patients, 13 (37.1%) died during the study period. Mean follow-up of the patients was 46.87 months, ranging from 1.12 to 209.54 months.

## **PD-L1 EXPRESSION**

Of the 35 primary penile PSCC tumors examined, 18 (51.4%) were considered PD-L1+ (Figure 1). Percentage of tumor cell membrane staining ranged from 1% to 80%. Clinico-pathologic characteristics of PD-L1+ and PD-L1 negative (PD-L1-) primary PSCC are presented in Table 2. PD-L1+ was predominant in lesions affecting glans (94.4%) and urethra (72.2%). Considering tumor grade, were grade I in 22.2%, grade II in 61.1% and grade III in 16.6%. PD-L1 was expressed in 69% of the patients with lymph node involvement.

PD-L1+ patients presented larger tumors, with median 4.25cm ( $p=0.027$ ). There was statistical correlation between PD-L1+ and p16 expression ( $p=0.002$ ). Patients with PD-L1+ had a trend to present high-grade tumors, grade II and III in 77.8% of the lesions vs. 22.2% grade I. PD-L1 was expressed in all patients with grade III PSCC ( $p=0.061$ ). There was a two-fold relationship in lymph node involvement of patients who expressed PD-L1 (69.2% of patients with lymph node involvement had PD-L1+ and only 30.8% had lymph nodes involvement with PD-L1-).

## **p16 EXPRESSION**

Immunohistochemical expression of p16 was considered positive in 13 patients (37.1%) (Figure 3). Tumor was predominating on glands in 100% of the patients, on urethra in 69.2% and on foreskin in 61.5%. Considering tumor grade, were grade I in 23.1%, grade II in 61.5% and grade III in 15.4%. p16 was expressed in 38.5% of patients with lymph node involvement. Clinico-pathologic characteristics of p16 expression on PSCC are presented in Table 3.

## **SURVIVAL OUTCOMES**

No statistically significant differences on survival at 5-year was observed according to PD-L1 expression. The 5-year survival in PD-L1+ was 42.6% vs. 59.2% in PD-L1-. The hazard ratio (HR) was 2.13 with 95% confidence interval ranging from 0.67 to 7.71 ( $p=0.199$ ) - Figure 2.

Similarly, no statistically significant differences on survival at 5-year was observed according to p16 expression. The 5-year survival in p16+ was 43.9% vs. 55.4% in p16-. The hazard ratio (HR) was 1.52 with 95% confidence interval ranging from 0.50 to 4.62 ( $p=0.458$ ) - Figure 4

## **DISCUSSION**

Advanced PSCC is a rare and fatal malignancy with limited treatment options including surgery, radiation therapy, and systemic chemotherapy. However, available therapies have not resulted in meaningful clinical benefit.<sup>15</sup> A challenge in developing novel systemic strategies for advanced penile cancer is the limited understanding of the oncogenic drivers of disease.

Important differences in terms of risk factors have been identified across distinct populations. In developed countries PSCC is more common in regions with a higher prevalence of HPV (HPV-16 and HPV-18). Conversely, PSCC is associated with poor hygiene habits, tobacco use and maybe sexual behavior, such as sex with animals that is common in rural areas in Brazil. Understanding the diversity of PSCC biology and possible correlation to clinico-pathologic characterization may help to

define the role of HPV infection in the oncogenesis of PSCC, especially in a population from a developing country.

Recently, PD-L1 immunotherapy has been approved to be used in renal-cell carcinoma and bladder cancer.<sup>13; 16</sup> Immunotherapy has been studied in few trials enrolling PSCC patients (NCT02837042 and NCT02834013). Encouraging data has been published in a case report of a patient with chemoradiation-refractory advanced PSCC using nivolumab, presenting partial response with reduction of lymph node metastasis.<sup>17</sup> It has been reported that the response to anti-PD-1 therapy is correlated with PD-L1 tumor expression.<sup>18</sup>

Recently, Udager and colleagues were among the first to report the PD-L1 expression in a cohort of 37 patients with PSCC. The PD-L1 expression was 62.2% of the PSCC. Despite the small size of the sample, they found that PD-L1 expression was mainly found in the usual type histology and was associated with regional lymph node metastasis and decreased cancer specific survival (CSS).<sup>19</sup> They also found that among the warty and verrucous type histology, both with typically better outcomes, none expressed PD-L1. Similarly, our study has shown a non-statically significant association between higher tumor grade and PD-L1 expression. Interestingly, in their study, 9 patients with matched primary and metastatic PSCC had a strong correlation of PD-L1 expression.

In a retrospective multi-center study, Deng and colleagues evaluated the expression of PD-L1 in both tumor cells and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in a cohort of 116 patients. They found that 53.4% of the patients had positive expression of PD-L1 and that higher PD-L1 expression was associated with shorter CSS and increased CD8+ TIL.<sup>20</sup>

In addition, a retrospective cohort evaluating 213 patients, found that 48% were considered PD-L1+ using the same cut-off for positivity (more than 1% of tumor cell staining). PD-L1+ was significantly correlated with tumor grade of differentiation. In this study they also analyzed the pattern of expression of PD-L1 and 62% had a marginal expression and 38% has a diffuse pattern. The diffuse expression was associated with lymph node metastases and poor survival. Of the PD-L1+ patients, 82% were negative for HPV infection.<sup>21</sup> It is important to note that all patients came from developed countries.

In our study approximately 51.4% of the PSCC were PD-L1+. Predominant histology was the usual subtype. PD-L1+ tumors presented statistical significance with risk factors for disease of greater clinico-pathological aggressiveness and were larger than those with PD-L1-. We also found that PSCC PD-L1+ had a statistical correlation with p16 expression. p16 expression on this study is in contrast to those previously published by Ottenhof et al.<sup>21</sup> There was a trend toward PD-L1 expression and high-grade tumors as found in previous studies.<sup>19; 21</sup> Although no statistical significance, there was a two-fold relationship in lymph node involvement in PD-L1+ group (69.2% vs. 30.8%). No differences were identified between the PD-L1 groups and the presence of vascular invasion and perineural invasion, both known as risk factors of aggressiveness in PSCC. No statistical significance in the analysis of 60-month survival of patients with PD-L1 expression was detected.

Two recent publications have outlined the genomic landscape of PSCC<sup>13; 22</sup>, providing a rationale for targeted agents working in this disease. Key molecular alterations in PSCC are loss of heterozygosity at *CDKN2A*, alterations of *TP53*, and high levels of *EGFR* overexpression suggesting that this signaling pathway may play an important role in PSCC carcinogenesis and tumor progression. Molecular studies

from endemic countries to assess whether the biology is distinct, particularly in light of HPV status are warranted.

Our study has several limitations. First, PSCC is a very rare disease and we evaluated a small cohort of patients. In addition the retrospective nature of analysis may affect the results. Furthermore, differences in choice of antibody, scoring method and cut-off values may impact the immunohistochemical analysis and outcomes. In addition, considering the small group size for patients with PD-L1+ and a small number of deaths, a multivariate analysis may not properly adjust the association of PD-L1 expression and clinical outcomes. Moreover, the relatively short follow-up period may influence the correlation of PD-L1 expression and survival.

According to previous studies evaluating the response to anti-PD-L1 immune therapy in different tumors<sup>13; 22; 23; 24</sup> the positivity in PD-L1 expression by tumor cells may be related to higher treatment response rates. There appears to be a possibility that some PSCC are susceptible to immune therapies involving anti-PD-L1.

In conclusion PD-L1 expression appears to be associated with p16 expression, larger tumors, higher proliferative rate and worse clinical outcomes in PSCC from developing countries. It provides a rational and opens new avenues for the investigation PD-1/PD-L1 inhibitors in the advanced disease.

## REFERENCE

- <sup>1</sup> BACKES, D. M. et al. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes Control**, v. 20, n. 4, p. 449-57, May 2009. ISSN 1573-7225. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082746>>.
- <sup>2</sup> GUIMARÃES, G. C. et al. Penile cancer: epidemiology and treatment. **Curr Oncol Rep**, v. 13, n. 3, p. 231-9, Jun 2011. ISSN 1534-6269. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21373986>>.

- 3 GONZAGA-SILVA, L. F. et al. [Brazilian Society of Urology. Guidelines on penile neoplasm]. **Int Braz J Urol**, v. 33 Suppl 1, p. 55-75, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 1677-5538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638468> >.
- 4 PHAM, M. N. et al. Contemporary survival trends in penile cancer: Results from the National Cancer Database. **Urol Oncol**, Sep 2017. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28882672> >.
- 5 RIPPENTROP, J. M.; JOSLYN, S. A.; KONETY, B. R. Squamous cell carcinoma of the penis: evaluation of data from the surveillance, epidemiology, and end results program. **Cancer**, v. 101, n. 6, p. 1357-63, Sep 2004. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15316902> >.
- 6 MENTRIKOSKI, M. J. et al. Histologic and immunohistochemical assessment of penile carcinomas in a North American population. **Am J Surg Pathol**, v. 38, n. 10, p. 1340-8, Oct 2014. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210933> >.
- 7 KREIMER, A. R. et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 2, p. 467-75, Feb 2005. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734974> >.
- 8 FLAHERTY, A. et al. Implications for human papillomavirus in penile cancer. **Urol Oncol**, v. 32, n. 1, p. 53.e1-8, Jan 2014. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239463> >.
- 9 BEZERRA, S. M. et al. Human papillomavirus infection and immunohistochemical p16(INK4a) expression as predictors of outcome in penile squamous cell carcinomas. **Hum Pathol**, v. 46, n. 4, p. 532-40, Apr 2015. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25661481> >.
- 10 LITTMAN, D. R. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1186-90, Sep 2015. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26359975> >.
- 11 UEDA, K. et al. Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. **Urol Oncol**, v. 36, n. 11, p. 499.e9-499.e16, 11 2018. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30131293> >.
- 12 HUANG, Y. et al. The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer. **Oncol Rep**, v. 33, n. 6, p. 3075-84, Jun 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963805> >.
- 13 MOTZER, R. J. et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. **N Engl J Med**, v. 373, n. 19, p. 1803-13, Nov 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26406148> >.

- 14 PICHLER, R. et al. PD-L1 expression in bladder cancer and metastasis and its influence on oncologic outcome after cystectomy. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 66849-66864, Sep 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978000> >.
- 15 MOSSANEN, M. et al. 15 Years of penile cancer management in the United States: An analysis of the use of partial penectomy for localized disease and chemotherapy in the metastatic setting. **Urol Oncol**, v. 34, n. 12, p. 530.e1-530.e7, 12 2016. ISSN 1873-2496. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27495001> >.
- 16 NECCHI, A. et al. Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. **J Clin Oncol**, p. JCO1801148, Oct 2018. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30343614> >.
- 17 TRAFALIS, D. T. et al. Evidence for Efficacy of Treatment With the Anti-PD-1 Mab Nivolumab in Radiation and Multichemorefractory Advanced Penile Squamous Cell Carcinoma. **J Immunother**, v. 41, n. 6, p. 300-305, 2018 Jul/Aug 2018. ISSN 1537-4513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29642086> >.
- 18 TOPALIAN, S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **N Engl J Med**, v. 366, n. 26, p. 2443-54, Jun 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658127> >.
- 19 UDAGER, A. M. et al. Frequent PD-L1 expression in primary and metastatic penile squamous cell carcinoma: potential opportunities for immunotherapeutic approaches. **Ann Oncol**, v. 27, n. 9, p. 1706-12, 09 2016. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27217541> >.
- 20 DENG, C. et al. Tumor PD-L1 expression is correlated with increased TILs and poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 2, p. e1269047, 2017. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28344882> >.
- 21 OTTENHOF, S. R. et al. Expression of Programmed Death Ligand 1 in Penile Cancer is of Prognostic Value and Associated with HPV Status. **J Urol**, v. 197, n. 3 Pt 1, p. 690-697, Mar 2017. ISSN 1527-3792. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27697578> >.
- 22 BRAHMER, J. et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, v. 373, n. 2, p. 123-35, Jul 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26028407> >.
- 23 BORGHAEI, H. et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, v. 373, n. 17, p. 1627-39, Oct 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412456> >.

24 ROBERT, C. et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. **N Engl J Med**, v. 372, n. 4, p. 320-30, Jan 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399552> >.

**Tabela 1. Patients characteristics**

Patients	35	100%
White	33	94.2%
Black	02	5.8%
Subtype		
Usual	31	88.5%
Verrucoso	04	11.5%
Local		
Foreskin	23	65.7%
Glans	33	94.2%
Corpus Spongiosum	17	48.5%
Corpus Caverosum	09	25.7%
Urethra	19	54.3%
Grade I	13	37.2%
II	19	54.3%
III	03	8.6%
Penectomy		
Parcial	22	62.8%
Total	13	37.2%
Linfadenectomy	15	42.8%

**Table 2: Clinicopathologic characteristics according to PD-L1 expression in PSCC**

	PD-L1 – n=17	PD-L1 + n=18	<i>p</i>
<b>Size, cm</b>			
Median	2.6	4.25	0.027
Range	1.5 – 5.5	1.7 – 16.0	
<b>Subtype</b>			
Usual	14 (82.4%)	17 (94.4%)	0.338
Verrucous	3 (17.6%)	1 (5.6%)	
<b>Grade</b>			
I	9 (52.9%)	4 (22.2%)	0.061
II	8 (47.1%)	11 (61.1%)	
III	0	3 (16.7%)	
<b>Clinical Stage</b>			
Localized	14 (82.4%)	13 (72.2%)	0.691
Advanced	3 (17.6%)	3 (27.8%)	
<b>Perineural Invasion</b>	2(11.8%)	6 (33.3%)	0.228
<b>Vascular Invasion</b>	1 (5.9%)	4 (22.2%)	0.338
<b>Lymphnode +</b>	4 (23.5%)	9 (50.0%)	0.164
<b>p16+</b>	3 (17.6%)	10 (55.5%)	0.035

**Table 3: Clinicopathologic characteristics according to p16 expression in PSCC**

	p16 – n=22	p16 + n=13	<i>p</i>
<b>Size, cm</b>			
Median	3.2	3.5	0.682
Range	1.5 – 10.0	1.7 – 16.0	
<b>Subtype</b>			
Usual	19 (86.4%)	12 (92.3%)	0.522
Verrucous	3 (13.6%)	1 (7.7%)	
<b>Grade</b>			
I	10 (45.5%)	3 (23.1%)	0.297
II	11 (50.0%)	8 (61.5%)	
III	1 (4.5%)	2 (15.4%)	
<b>Clinical Stage</b>			
Localized	16 (72.7%)	11 (84.6%)	0.680
Advanced	6 (27.3%)	2 (15.4%)	
<b>Perineural Invasion</b>	4 (18.2%)	4 (30.8%)	0.433
<b>Vascular Invasion</b>	3 (13.6%)	2 (15.4%)	0.626
<b>Lymphnode +</b>	6 (27.2%)	7 (53.8%)	0.552

<b>PD-L1+</b>	8 (36.4%)	10 (76.9%)	0.035
---------------	-----------	------------	-------

Figure 1: PD-L1 positive membranous staining, 200x

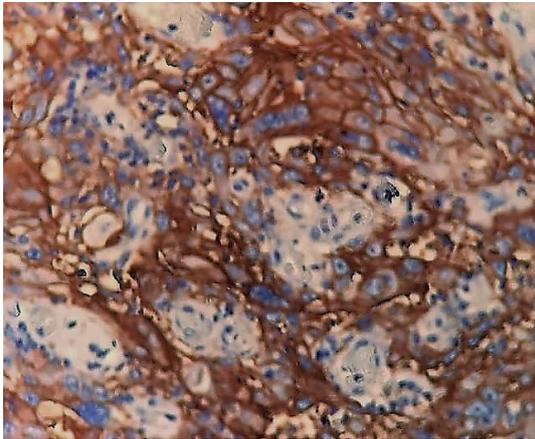


Figure 2: Overall Survival and PD-L1 expression

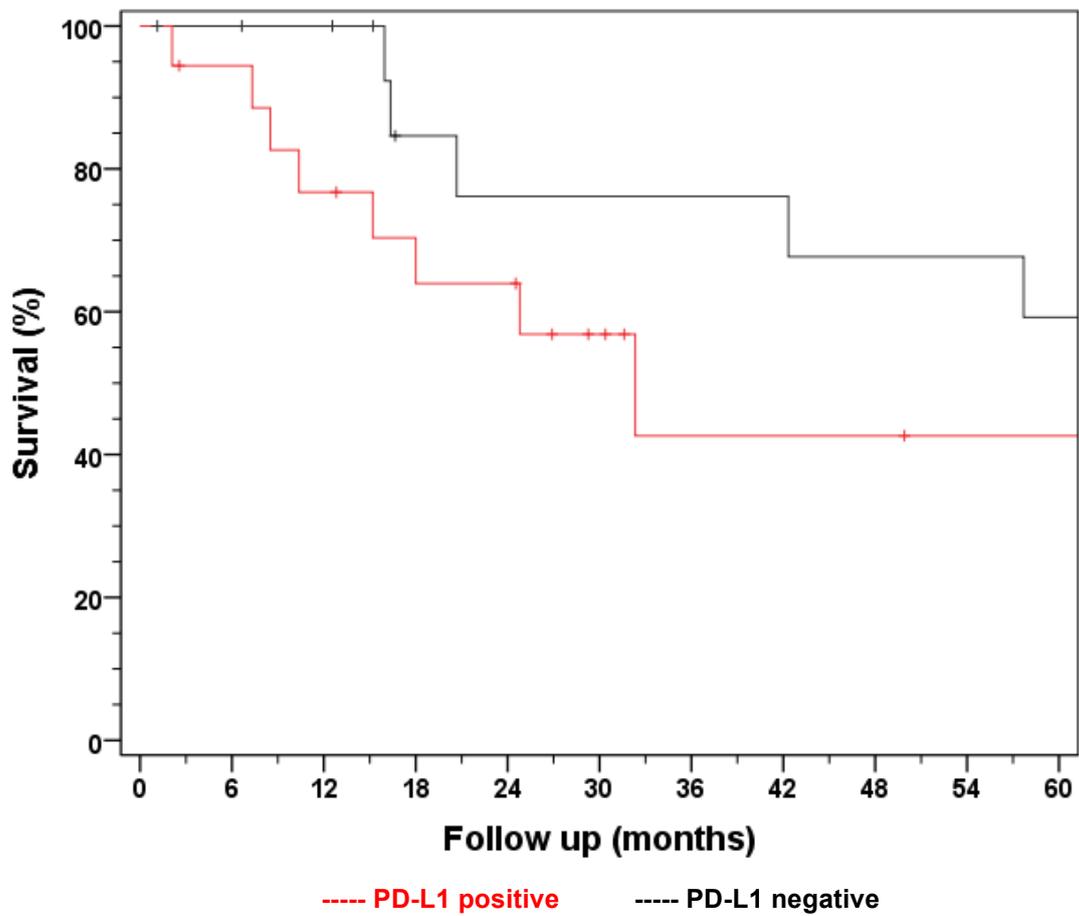


Figure 3: p16 positive nuclear staining, 400x

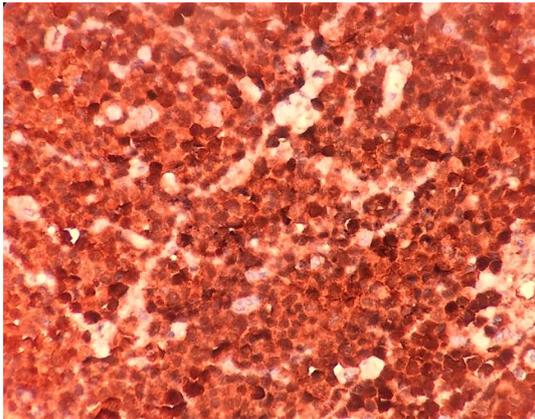


Figure 4: Overall Survival and p16 expression

