



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO-UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE-CCBS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE-PPGCS
DOUTORADO

SULAYNE JANAYNA ARAÚJO GUIMARÃES

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES
IMUNOLÓGICAS SISTÊMICAS E LOCAIS EM PACIENTES COM CÂNCER
DE PÊNIS**

São Luis
2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos
pelo(a) autor(a).

Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

GUIMARAES, SULAYNE JANAYNA ARAUJO.

Análise de alterações Imunológicas sistêmicas e locais em pacientes com
câncer de pênis / SULAYNE JANAYNA ARAUJO GUIMARAES. -
2022.

104 f.

Orientador(a): ANA PAULA SILVA DE AZEVEDO DOS SANTOS.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUIS, 2022.

1. Cancer de pênis. 2. Dendritic cells. 3. Escape
Tumoral. 4. Mediadores Inflamatórios. 5. Perfil Th17. I.
SANTOS, ANA PAULA SILVA DE AZEVEDO DOS. II. Título.

SULAYNE JANAYNA ARAÚJO GUIMARÃES

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES
IMUNOLÓGICAS SISTÊMICAS E LOCAIS EM PACIENTES COM CÂNCER
DE PÊNIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

São Luis

2022

SULAYNE JANAYNA ARAÚJO GUIMARÃES

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES
IMUNOLÓGICAS SISTÊMICAS E LOCAIS EM PACIENTES COM CÂNCER
DE PÊNIS**

Área de concentração: Imunologia do câncer

Parecer da Defesa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos (Universidade Federal do Maranhão)
Dra em Ciências – Imunologia - Orientadora

Professor. Dra Ana Paula Lepique (Universidade de São Paulo)
Dra em Ciências Biológicas – Bioquímica - Titular

Professor. Dr Paulo Vitor Soeiro (Universidade Federal do Maranhão)
Dr em Ciências – Imunologia- Titular

Professor. Dra Flávia Castello Branco Vidal (Universidade Federal do Maranhão)
Dra em Biologia Humana e experimental – Titular

Professora. Dra Thiare Silva Fortes da Cunha (Universidade Federal do Maranhão)
Dra em Ciências da da Saúde - Suplente

DEDICATÓRIA

À minha família, especial a minha Avó, Mãe, Tias.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não podem dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria” Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e toda ancestralidade que permitem a nossa existência e manter nossos corações esperançosos de dias melhores.

Agradeço a minha Mãe/Avó Maria de Lourdes a pessoa mais iluminada que conheço, mulher firme e que ama ajudar o próximo, que sempre esteve comigo e que me criou na disciplina, mas me permitindo ótimas oportunidades.

Agradeço a minha madrinha Aracea Carvalho e Camila Carvalho que não só me acolheu em seu Lar, mas também em seu coração. É exemplo de militância e profissional. Fez os melhores café da manhã e as comidinhas e me deu todo apoio sem o qual não conseguiria ter terminado essa pesquisa.

Agradeço aos meus pais Conceição de Maria Araujo e Jose do Espírito Santo Abreu Guimarães, pessoas humildes e que são grande inspiração de sabedoria e de luta.

Agradeço a minha família que é constituída por mulheres fortes, que me apoiam, me consolam, me inspiram. Em especial a minha tia Fátima (in memoriam) que foi um ser de luz e distribuiu muito amor em sua vida.

Agradeço ao meu irmão Wagner que muita das vezes deu o puxão de orelha que me fez enxergar o quanto o meu trabalho era importante e o quanto eu era importante também.

Agradeço as minhas irmãs Letycia, Laryssa e Vitótia, meu irmão Jailsom, minha prima Rayssa, minha madastra Lourenilde, sua irmã Rosangela e toda sua família que estavam sempre presentes e preocupados com minha saúde e o meu bem-estar.

Agradeço a Profa Dra Ana Paula Azevedo pela oportunidade de conduzir essa belíssima pesquisa e por toda orientação no doutorado que me fez crescer e buscar agregar as características que o título de Doutora pede.

Agradeço aos meus colegas de laboratório (Mirtes Branco, Andre Vale, Elis Victor, Leticia Prince, Diego, Ana Luiza Butarelli, Danrley, Ana Mesquita, Mariana, Luis Eduardo, Ana Serpa, Hiran, Josélia- agregada) por compartilhar os diversos momentos de angústia (quando experimento não dava certo) e euforia (quando chegava reagente novo) e por toda cumplicidade ao longo desses mais de 4 anos.

Agradeço as pessoas zelam pelas instituições e que acompanham diversas histórias, ajudando com palavras ou aquele café forte, Dona Dica, Dona Dinalva, Dona Joana, Dona Fátima.

Agradeço aos professores do LIF pelas valiosas dicas que permitiram o amadurecimento científico.

Agradeço aos colegas LIF (Regis, Victor, Liana, Irrla, Gleycka, Jhonny, Danyelle, Alex, Arthur) e LPI (Dona Sônia, Lilian, Douglas, Lais, Jefferson, Luana, Carol, Loriane, Andressa) e todos os demais com os quais dividi horas de lanche, festas, cálculos e experimento.

Agradeço a UFMA, ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

Agradeço aos pacientes que permitiram a realização dessa pesquisa.

Agradeço ao Hospital Aldenora Belo pela anuência da realização da pesquisa em especial os médicos Ronald Coelho e Leudivan.

Agradeço ao LABGEN, pelo suporte científico e de recursos materiais, em especial Profa Dra Silma Regina, Profa MSc. Vera, Santana, Jenilson Mota.

Agradeço a agência de fomento FAPEMA pelo auxílio para realização do projeto.

RESUMO

O câncer de pênis (CaPe) é uma malignidade rara e com terapêutica limitada para a doença com características mais agressivas. As terapias baseadas no sistema imunológico são modalidades que têm apresentado grande eficácia em vários estágios dos carcinomas. Com o objetivo de permitir uma caracterização integral de resposta antitumoral dos pacientes com CaPe, avaliamos o perfil imunológico e a funcionabilidade de células dendríticas derivadas de monócitos desses pacientes. Para isso, amostras de sangue periférico foram coletadas para geração de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs), análise da imunofenotipagem de linfócitos, ensaio de apoptose e proliferação; e tecidos tumorais foram usados para detecção de citocinas e fenotipagem de células imunes infiltradas no tumor. Os dados clínico-histopatológicos foram obtidos de 35 pacientes com CaPe. Mo-DCs obtidas do sangue periférico de 19 doadores saudáveis foram usadas como controle. A análise das citocinas plasmáticas não mostrou diferença entre os grupos caso e controle, porém, os níveis de IL-6 e IL-4 foram 3x e 4x, respectivamente, maiores nos pacientes do que nos doadores saudáveis. A frequência de subpopulações de linfócitos não foi diferente entre doadores e pacientes, entretanto a razão CD4⁺/CD8⁺ foi maior ($p=0,0143$) nos pacientes. No ensaio de geração e ativação de células dendríticas derivadas de monócitos, as mo-DCs do paciente tem menor expressão da molécula coestimuladora CD86 ($p=0,0004$). Ainda, a capacidade aloestimulante de linfócitos saudáveis ($p=0,0456$) foi menor pelas mo-DCs dos pacientes. Além disso, A co-cultura das mo-DC dos pacientes com os linfócitos alogênéticos de doadores saudáveis mostrou produção de IL-17 ($p=0,0262$). No ensaio de apoptose de linfócitos cultivados com sobrenadante do tumor, os linfócitos de pacientes com CaPe apresentaram menor morte, comparado com linfócitos saudáveis. No perfil de células imunes infiltradas no tumor, os dados apresentaram maior frequência de células T CD3⁺ (7,99%) e ainda elevada expressão de PDL-1 no tumor ($p=0,0010$). Por fim, os dados mostraram uma correlação clínica significativa entre o estadiamento do tumor e a expressão da superfície celular de moléculas CD86 ($r^2=0,5751$, $p=0,0349$) e PD-L1 ($r^2=0,7220$, $p=0,00092$) em mo-DCs. Os resultados sugerem que pacientes com carcinoma de pênis apresentam um perfil imunossupressor, abrindo perspectivas para uma melhor compreensão do microambiente tumoral e potencial para restaurar ou imunomodular componentes empregados na imunoterapia antitumoral.

Palavras chave: Cancer de pênis, Sistema Imune, citocinas, Escape tumoral, células dendríticas, Th17, Imunomodulação.

ABSTRACT

Penile cancer (CaPe) is a rare malignancy with limited therapy for the disease with more aggressive characteristics. Therapies based on the immune system are modalities that have shown great effectiveness in various stages of carcinomas. With the aim of allowing a comprehensive characterization of the antitumor response of patients with CaPe, we evaluated the immunological profile and functionality of dendritic cells derived from monocytes from these patients. For this, peripheral blood samples were collected for the generation of monocyte-derived dendritic cells (mo-DCs), for lymphocyte immunophenotyping analysis, apoptosis and proliferation assay; and tumor tissues were used for cytokine detection and phenotyping of immune cells infiltrating the tumor. Clinical and histopathological data were obtained from 35 patients with CaPe. Mo-DCs obtained from the peripheral blood of 19 healthy donors were used as controls. Plasma cytokine analysis showed no difference between case and control groups, however, IL-6 and IL-4 levels were 3x and 4x, respectively, higher in patients than in healthy donors. The frequency of lymphocyte subpopulations was not different between donors and patients, however the CD4⁺/CD8⁺ ratio was higher ($p=0.0143$) in patients. Patients have lower expression of the costimulatory molecule CD86 ($p=0.0004$). Furthermore, the allostimulatory capacity of healthy lymphocytes ($p=0.0456$) was lower for the patients' mo-DCs. Moreover, co-culture of mo-DC from patients with allogeneic lymphocytes from healthy donors showed IL-17 production ($p=0.0262$). In the apoptosis assay of lymphocytes cultured with tumor supernatant, lymphocytes from patients with CaPe showed less death level compared to healthy lymphocytes. In the profile of immune cells infiltrating in the tumor, the data showed a higher frequency of CD3⁺ T cells (7.99%) and even high expression of PDL-1 ($p=0.0010$). Finally, the data showed a significant clinical correlation between tumor staging and cell surface expression of CD86 ($r^2=0.5751$, $p=0.0349$) and PD-L1 ($r^2=0.7220$, $p=0.0092$) on mo-DCs. The results suggest that patients with penile carcinoma have an immunosuppressive profile, opening perspectives for a better understanding of the tumor microenvironment and the potential to restore or immunomodulate components used in antitumor immunotherapy.

Keywords: Penile cancer, Immune System, Inflammatory Mediators, Tumor escape, dendritic cells, Th17, Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As três fases da progressão tumoral, eliminação, equilíbrio e evasão.....	18
Figura 2. Estimativa da taxa de incidência randomizada por idade (Mundo) em 2020, localização: pênis, sexo: homens, todas as idades. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (https://gco.iarc.fr/today).	24
Figura 3. Estimativa da taxa de mortalidade randomizada por idade (Mundo) em 2020, localização: pênis, sexo: homens, todas as idades. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (https://gco.iarc.fr/today).	25
Figura 4. Estimativa da taxa de incidência e mortalidade por CaPe em homens de todas as idades segundo o IDH. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (https://gco.iarc.fr/today).	25
Figura 5. Estimativa da taxa de incidência e mortalidade de CaPe em homens de todas as idades, no mundo. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (https://gco.iarc.fr/today).	26
Figura 6. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma). Fonte: INCA (2020).....	27
Figura 7. Mortalidade proporcional não ajustada por câncer de pênis, nordeste do Brasil, grupo CID10- 60, de 1999 a 2019. (DATASUS, 2021)	27
Figura 8. Comparativo do IDH entre municípios no Maranhão e com os demais Estados do Brasil.....	29
Figura 9. Processo de oncogênese dependente das oncoproteínas virais. Fonte: adaptado de VANTHOOR et al. (2021), com figura criada no Biorender.com.....	34
Figura 10. Anatomia peniana e distribuição dos componentes teciduais e imunológicos em condição de homeostasia. (Adaptado de TORTOREC et al., 2020).....	37
Figura 11. Processo de cicatrização e associação com neoplasia (Fonte: HUYNH et al., 2019).....	39
Figura 12. O papel do STAT3- no processo de oncogênese (HUYNH et al., 2019).....	39
Figura 13. Genes alvo de NF- κ B envolvidos no desenvolvimento e progressão da inflamação (adaptado de LIU et al., 2017).....	42
Figura 14. Anatomia da região peniana.....	44
Figura 15. Classificação de Jackson. Estádio I: Tumor limitado à glândula e/ou ao prepúcio; Estádio II: Tumor invade corpo cavernoso; Estádio III: Tumor com metástase (s) para linfonodo (s) inguinal (is); Estádio IV: Tumor invade estrutura adjacente ou presença de linfonodos inoperáveis ou metástase (s) a distância. Autor: 2022 (criado no Biorender.com).....	46
Figura 16. Classificação para estadiamento prognóstico pela ATCC. Adaptado de Thomas et al. (2021).....	46
Figura 17. Células dendríticas e ativação de resposta imune (POOREBRAHIM et al. 2020).....	51
Figura 18 Análise de vias de interação com miRNA 107, usando algoritmo DIANA-miRPath v.3.0. (Autora, 2022).....	55
Figura 19. Moléculas codificadas por genes superexpressos no CaPe que alteram a maturação de DCs e resposta imune de células Th1. Fonte: Criado pela autora, 2022 (biorender.com).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Nova classificação de Câncer de pênis e escroto segundo a OMS (MOCH et al;. 2022).....	46
Tabela 2. Características clínicas de pacientes diagnosticados com câncer de pênis, 2017 a 2021, São Luis, Maranhão, Brasil.....	76
Tabela 3. Características sociodemograficas de pacientes diagnosticados com câncer de pênis, 2017 a 2021, São Luis, Maranhão, Brasil.....	78
Tabela 4. Informações técnicas dos painéis, marcadores, fluoróforos e detalhes de fabricantes usados para a técnica imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	80
Tabela 5. Correlação entre características clínicas e células imunes no sangue e tumor de pacientes com PeCa, 2017 a 2021, São Luis, Maranhão, Brasil.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APCs	Traduzdo Células apresentadoras de antígenos (APCs)
CaPe	Câncer de Pênis
CCEP	Carcinoma peniano de células escamosas
CID	Código Internacional de Doenças
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DCs	Células dendríticas
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HLA	Antígenos leucocitários humano
HPV	Papiloma vírus humano
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCa	Instituto Nacional do Câncer
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Mo-DC	Células dendríticas derivadas de monócitos
OS	Sobrevida Global
PDL-1	Ligante de morte programada 1
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinositido 3 quinase
TNM	Tumor, nódulo e metástase
AHRQ	<i>Agência de Pesquisa em Saúde e Qualidade</i>
MAPK	Proteína quinase mitógeno ativado
ATCC	Companhia – Tipo de coleção de cultura Americana
CD	Grupos de Diferenciação (<i>Cluster differentiation</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisas do Câncer
OMS	Organização Mundial de Saúde
IL	Interleucina
MEC	Matriz extracelular
UICC	União Internacional de controle de cancer
LCs	Células de Langerhans
PNUD	Programa Nacional da Nações Unidas
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
AJCC	Comitê junta Americano no Câncer
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição ³
NK	Natural Killers

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
MDSC	Células supressoras derivadas de mieloides imunossupressoras
M2	Macrofágos tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
INF- γ	Interferon gama
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
PBS	Tampão fosfato salino
EDTA	Etilenodiaminotetracético
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
MCF-7	Fundação do Câncer de Michigan - 7

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Câncer.....	21
2.2 Epidemiologia do CaPe no Mundo.....	23
2.3 Epidemiologia do CaPe no Brasil.....	26
2.4 Fatores socioeconômicos do Maranhão e CaPe	28
2.5 Fatores de Risco para o CaPe.....	29
2.6 Diagnóstico, Estadiamento e Prognóstico do CaPe.....	43
2.7 Tratamento do CaPe.....	47
2. 8 Célula dendritica e imunoterapia.....	50
3. OBJETIVOS.....	57
3.1 Geral	57
3.2 Objetivos Específicos	57
3.2.1 Determinar <i>in vitro</i> as diferenças na expressão de marcadores de superfície nas Mo-DCs;	57
3.2.2 Identificar o percentual de células immune (linfócitos, NK, monócitos, DCs) no lisado tumoral;	57
3.2.3 Determinar <i>in vitro</i> o perfil de citocinas produzidas na co-cultura de Mo-DCs e linfócitos;	57
3.2.4 Analisar a correlação entre expressão de marcadores de superfície e secreção de citocinas pelas Mo-DCs o e sua atividade linfo-estimuladora ou inibitória;.....	57
3.2.5 Correlacionar as alterações morfológicas e imunofenotípicas em linfócitos, NK, monócitos, Mo-DCs, DCs associando com a infecção viral;	57
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 Aspectos Éticos	58
4.2 Tipo de Estudo.....	58
4.3 Coleta de Dados.....	58
4.3.1 Amostra do Estudo e Grupos Experimentais.....	58
4.3.2 Critérios de inclusão	58
4.3.3 Critérios de não inclusão	59
4.3.4 Coleta de sangue periférico, fragmento tumoral	59
4.4 Isolamento de Monócitos e Diferenciação em DCs	59
4.5 Ensaio de Proliferação de Linfócitos.....	60
4.7 Imunofenotipagem das células immune por Citometria de Fluxo.....	61
4.8 Detecção de Citocinas	62

4.10 Análise Estatística	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 Capítulo 01. Artigo 01. Pacientes com câncer de pênis exibem falha nas células dendríticas e modulação inflamatória por linfócitos: aspectos imunológicos de câncer negligenciado.....	64
Conflito de interesse	76
6. CONCLUSÃO DA TESE	92
REFERENCIAS TESE.....	93
ANEXOS.....	103
Anexo 1: Termo de consentimento.....	103
Anexo 2: Parecer Consustanciado do Comitê de Ética e Pesquisa.....	105

1.INTRODUÇÃO

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença que tem mostrado elevadas taxas de morbimortalidade em países em desenvolvimento. São relatados 12.000 novos casos em regiões com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) médio e a mortalidade chega perto de 6.000 casos por ano no mundo, embora seja considerado raro em países desenvolvidos (GLOBOCAN. 2022). A doença tem caráter localmente agressivo e mutilante que causa grande impacto no bem-estar do homem e ainda se constitui um dos importantes problemas de saúde negligenciados que necessita de aprofundamento científico, sobretudo a respeito dos eventos imunobiológicos associados aos processos peculiares da carcinogênese na região peniana (JOSHI et al., 2022).

Cerca de 95% dos casos de câncer de pênis são atribuídos ao subtipo histológico carcinoma de células escamosas. No geral, os fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma peniano envolvem processos inflamatórios crônicos provocados por inflamação prepucial crônica devido a fimose ou líquen, ausência de circuncisão na infância e consequente acúmulo de esmegma. Além disso, a idade superior a 60 anos (senilidade imunológica), tabagismo, etilismo, multiplicidade de parceiros sexuais, infecção pelo HPV, lesões intraepiteliais precursoras são fatores associados positivamente com a carcinogênese peniana (HAKENBERG et al, 2018).

Adicionalmente, na interação do conjunto de componentes das neoplasias e a resposta imune, ocorrem aspectos ambíguos uma vez que poderá se estabelecer, através da imunovigilância, a eliminação tumoral e/ou promover a edição de células neoplásicas mais resistentes, caracterizando, portanto, fases de influência mútua do tumor com a resposta imune, à saber: de eliminação, de equilíbrio e de evasão (Figura 1) (DUNN et al., 2002; DOUGLAWI; MASTERSON, 2019; OLESEN, et al. 2019; JOSHI et al., 2022).

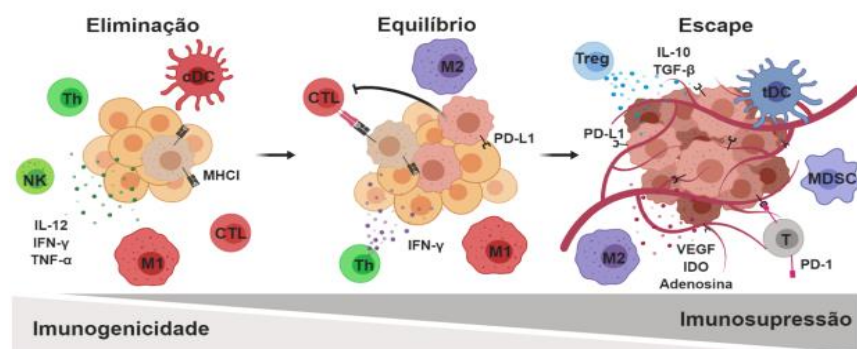


Figura 1. As três fases da progressão tumoral, eliminação, equilíbrio e evasão (Criado no site Biorender.com).

A fase de eliminação envolve detecção e eliminação tumoral antes da proliferação e mobiliza células NK, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD8+, linfócitos T CD4+, linfócitos Treg e linfócitos B (PALUCKA e COUSSENS, 2016). A interação da imunidade inata e adaptativa é primordialmente mediada pela célula dendrítica (DC). No sangue, podem ser encontradas os precursores das DCs que vão se diferenciar em DCs imaturas até o momento do contato com os antígenos e exposição à mediadores inflamatórios, após esses eventos, as DCs estarão maduras e assim ativam linfócitos T nos órgãos linfóides secundários.

As células imaturas possuem altos níveis de receptores para quimiocinas (CCR) como CCR1, CCR5 e CCR6, baixos níveis de CCR7 e das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40. Enquanto isso, as células maduras caracterizam-se pela grande expressão de moléculas de MHC classe II, CCR7, moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD40 (GAJEWSKI, SCHREIBER, FU, 2013; LIN et al., 2017). As DCs captam antígenos (Ags) de tecidos periféricos ou centrais por meio de receptores e apresentam esses Ags usando moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Então, as DCs migram para os tecidos linfóides e ativam as células T (CD4+, CD8+) e produção de IL2 e IFN- γ (YAO et al., 2017). Assim, as DCs medeiam a detecção de Ag e a ativação de células T e são uma das células mais importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas que vão direcionar as células T para a redução da proliferação celular tumorigênica, a produção de substâncias pró-apoptóticas e angiostáticas (MILDNER e JANGER 2014).

Na etapa de equilíbrio, as células e moléculas do sistema imune exercem uma pressão que seleciona (mantém viáveis) as células transformadas menos imunogênicas

(assim formadas em decorrência da instabilidade genômica e alterações epigenéticas), as quais eventualmente promovem a progressão da doença (CASWELL, SWANTON, 2017). Enquanto na etapa de evasão, essas variantes neoplásicas com menor potencial imunogênico adquirem capacidade proliferativa e promovem a progressão tumoral. Nesse momento, as células tumorais superam as eficientes barreiras imunológicas uma vez que adquirem estratégias imunoevasivas, tais como superexpressão de proteínas inibitórias do sistema imune, recrutamento de células supressoras mieloides, diminuição de moléculas coestimulatórias, estímulo à produção de mediadores antiinflamatórios, liberação de fatores solúveis que interferem na diferenciação, maturação e ativação das células imune (VALENT et al., 2013; MOHME, 2017).

É bem explorado que tumores com altas taxas de antígenos tumorigênicos ou aqueles de origem viral apresentam estreita relação com a resposta imune uma vez que considerando o processo de imunedição estes se mostram mais suscetíveis a serem identificados pelo sistema imunológico em virtude do reconhecimento e da montagem de respostas específicas aos antígenos tumor associados ou virais. A presença da infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), é um dos principais fatores de risco para o câncer de pênis com taxa de detecção mundiais próximas de 50% e no Brasil essa detecção ultrapassa 80% dos casos (MACEDO et al., 2020; COELHO et al., 2018). Via de regra, as alterações celulares decorrentes da infecção pelo HPV e consequente integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, é mediada pela resposta imune celular. Alguns dados mostram na composição do infiltrado inflamatório a presença de macrófagos e linfócitos T CD4+ em condilomas que regredem espontaneamente, e, ainda, há uma resposta linfoproliferativa de linfócitos T CD4+ específica, para o antígeno E2 (proteína HPV ciclo específica), que está associada à eliminação do HPV. Além disso, linfócitos T CD8+ específicos para os antígenos E6 e E7 são encontrados em pacientes com grandes lesões ou com tumor quando analisados no contexto da neoplasia de colo de útero, cuja detecção de HPV é >99% (LEE et al., 2011; SONG et al., 2015).

Além disso, na interação HPV e carcinogênese já foi demonstrando alguns mecanismos que participam no escape da resposta imune das células infectadas com HPV entre os quais estão a regulação negativa do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, defeitos no processamento do antígeno de classe I, a interrupção da produção de citocinas inflamatórias, a resposta imune mediada por queratinócitos, à regulação positiva de moléculas inibitórias tais como PD-L1 ou IL-10, a evolução de uma

resposta auxiliar do tipo 2 (Th2) distorcida durante a progressão neoplásica e indução de linfócitos T reguladores (SYRJANEN et al., 2009; KOJIMA et al., 2013; MEZACHE et al., 2015).

Diante desse cenário, o processo que envolve a apresentação antígenoica ou ativação e expansão clonal leva a indução de vias de sinalização específicas. Estes sinais ativam os mecanismos reponsáveis pela eliminação tumoral e regulação da resposta imune. No estudo de Chahoud et al.(2020) foi verificado que a contagem média de células apresentadoras de antígenos (APCs), em particular macrófagos, estava associada a sobrevida média específica de CaPe, sobrevida global mediana (OS) e menor risco de recorrência regional.

No entanto, pesquisas que buscam elucidar melhor os mecanismos envolvidos na carcinogênese, bem como conhecer o papel do microambiente tumoral são numericamente limitadas. Embora, as investigações genéticas, moleculares e celulares mostram que os mecanismos de carcinogênese e progressão tumoral parecem ser favorecidos ou impedidos pela resposta imune peritumoral, no câncer de pênis, apenas análises como a detecção imuno-histoquímica de p16INK4a e PDL-1, o subtipo histológico, a frente de invasão tumoral e a coilocitose tem sido mais amplamente estudado e indicam fator prognóstico importante. Entretanto, esses estudos que buscaram investigar o papel da resposta inflamatória peritumoral em carcinomas de pênis utilizaram somente coloração de rotina com hematoxilina e eosina (HE), observação morfológica e correlação com características clínicas e não são suficientes para análise mais completa do CaPe (UDAGER et al., 2016; BRÜNDL et al., 2019 MULLER et al., 2022).

Considerando a elevada incidência do CaPe e - a necessidade de dados cientificamente concretos no conhecimento imunológico do câncer de pênis, a presente pesquisa dá continuidade às investigações realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer – LIAC, onde e, para tumores de mama foi observado a diminuição na expressão da molécula de superfície MHC de Classe II do tipo HLA -DR em células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC) tratadas com sobrenadante decorrente do cultivo celular da linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7.

Assim, diante dos dados evidenciados na literatura, hipotetizamos que o microambiente do câncer de pênis é capaz de interagir com as células de defesa do hospedeiro, em especial as células dendríticas e favorecer a falha na inicialização de uma resposta imune efetiva. Desse modo, no presente trabalho a fim de analisar os efeitos de

alterações imunológicas sistêmicas e locais em pacientes com câncer de pênis foram utilizadas técnicas robustas de investigação com material ex vivo, a saber: a) detecção de citocinas do plasma por citometria de fluxo; b) imunofenotipagem das células dendríticas derivadas de monócitos e dos linfócitos por citometria de fluxo; c) análise da proliferação dos linfócitos; d) caracterização fenotípica das células infiltradas no tumor; e) análise funcional das mo-DCs em linfócitos saudáveis; f) análise do sobrenadante tumoral em linfócitos saudáveis.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

O câncer representa um grupo complexo de doenças cuja causa está relacionada com sucessivas e persistentes alterações genéticas (perdas, ganhos ou trocas no DNA) e epigenéticas (metilação, acetilação e modificações nas proteínas histonas) na célula (TING et al., 2006; BORGES-OSÓRIO, ROBINSON, 2001; ROSE, JACKSON, 2002). Essas alterações ocorrem nos proto-oncogenes e genes supressores de tumores e permitem mudanças nos mecanismos que controlam a divisão, a diferenciação e a sobrevivência da célula, tornando-a com potencial de crescimento descontrolado, perda da capacidade natural de direcionar o mecanismo de apoptose (BALMAIN et al, 2003), bem como, capaz de escapar das respostas imunes, afetar o funcionamento e invadir tecidos e órgãos (BEACHY et al., 2004).

Essa instabilidade genômica nas células transformadas permite uma vasta complexidade de genótipos e fenótipos no carcinoma, assim alguns marcadores relacionados a diversidade genética, celular e tecidual, patologia e resposta à terapia foram propostos inicialmente por Hanahan e Weinberg (2011) para entender melhor os mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer, além de ajudar na ampliação de tratamentos.

As doze características/marcadores atuais que podem parcial ou totalmente se interconectarem compreendem as capacidades adquiridas para sustentar a sinalização proliferativa, evitar supressores de crescimento, resistir à morte celular, permitir a imortalidade replicativa, induzir/acessar a vasculatura, ativar a invasão e metástase, reprogramar o metabolismo celular e evitar a destruição imunológica, desbloqueio de plasticidade fenotípica, microbiomas polimórficos, células senescentes, reprogramação

epigenética não mutacional. Ainda, vale lembrar que esses processos são estabelecidos a partir por meio de inflamação promotora de tumor e que o microambiente tumoral (TME), aqui definido como composto por populações heterogêneas e interativas de células cancerígenas e células-tronco cancerosas desempenha importante papel na tumorigenese e progressão (HANAHAN, 2022). Nesse contexto, o conhecimento de uma caracterização mais global de cada tipo neoplasia permite a escolha de melhores tratamentos.

Do ponto de vista epidemiológico, o câncer merece grande atenção já que constitui a segunda maior causa de morte no mundo e, portanto, provoca elevado impacto psicológico, social e econômico. Uma estimativa realizada pela GLOBOCAN, em todo mundo, mostrou cerca de 19,3 milhões de novos casos e que quase 10,0 milhões de mortes por câncer ocorreram em 2020 (SUNG et al., 2021). No Brasil, as estimativas apontam que o país irá registrar 625 mil novos casos de câncer em cada ano do triênio 2020/2022. (INCa, 2019)

No ano de 2015, a *Agency for Healthcare research and Quality* (AHRQ) estimou que o gasto médico direto foi de 80,2 bilhões de dólares nos Estados Unidos. No geral, os custos do câncer são crescentes conforme o nível de progressão da doença, o tempo necessário para a terapêutica e os níveis das tecnologias de tratamento adequadas. No tocante a essa problemática, a *American Cancer Society* ponderou sobre a variação de 14,6 para 20,2 milhões de novos casos entre 2010 e 2030 e que a maioria deles ocorrerá nos países em desenvolvimento, onde os fatores de risco e os processos de promoção e prevenção do câncer são limitados (ACS, 2018).

No Brasil estamos passando por uma rápida transição epidemiológica no que tange as incidências das neoplasias em decorrência do aumento da expectativa de vida populacional. Destaca-se que no país, entre 1999 a 2015, os gastos somente com tratamento aumentaram de R\$ 470 milhões para R\$ 3,3 bilhões no país, porém cada vez mais é elevado número de casos de câncer detectados nos estádios mais avançados, mostrando que não necessariamente o elevado custo das terapias, mas a prevenção deficitária e a detecção tardia desfavorecem o quadro da doença dificultando o atendimento efetivo de todos os casos (KORKES et al., 2020).

Devido esse grande impacto, principalmente para os tipos de câncer mais frequentes, é reconhecido um esforço em montar/aprimorar uma logística para detecção

e implementação de ações que vão desde as possibilidades de prevenção, diagnóstico precoce, tratamento chance de cura, efeitos colaterais a curto e longo prazo, possibilidade de retorno da doença após o tratamento, chance de sobrevida longa com ou sem tratamento e efeitos na qualidade de vida. Dessa forma, é possível garantir mais chances de sucesso no tratamento. No entanto, algumas neoplasias como aquelas que apresentam fortes fatores socioculturais implicados (elevado tempo de acesso a consulta, realização de exames em tempo inadequado, falta de conhecimento da população, cultura pobre com a saúde pessoal) estão entre as neoplasias que são desafiadoras para os sistemas de saúde em diversos aspectos, sejam eles a prevenção, a detecção precoce, o diagnóstico adequado, o tratamento efetivo, seguimento correto etc.

A exemplo de câncer com grandes implicações socioeconômicas e culturais temos o CaPe como uma neoplasia maligna agressiva, frequentemente associada ao papilomavírus humano (HPV), e que embora seja pouco frequente em regiões desenvolvidas, ainda permanece uma importante questão de saúde pública para os países pobres e em desenvolvimento.

2.2 Epidemiologia do CaPe no Mundo

A epidemiologia de CaPe no mundo é distinta de acordo com as regiões. No continente africano as taxas mais elevadas estão em Eswatini, Uganda e Botsuana com 7, 4,6 e 4,4 novos casos a cada 100.000 homens respectivamente e as mais baixas na Líbia, em São Tomé e Príncipe e em Mauritânia, todas de valor zero. Na Europa essa taxa varia de 1,-7 a 0,37 novos casos a cada 100.000 homens, destacando Islândia, Macedônia do Norte e Luxemburgo com maiores incidências nesse continente, Figura 2. No continente asiático, Nepal, Índia e Mianmar apresentaram incidência de 1,7, 1,6 e 1,5 novos casos a cada 100.000 homens, respectivamente.

Os países de tradição mulçumana conhecidos por realizar circuncisão ainda na idade infantil, apresentam baixos valores de novos casos, a saber: Irã (0,11) e Iraque (0,00) novos casos a cada 100.000 homens. Na América do norte, Canadá e Estados Unidos apresentam baixas incidências, 0,57 e 0,50 novos casos a cada 100.000 homens, respectivamente. Já na América do Sul, Santa Lúcia e Paraguai apresentaram estimativa de 3,9 e 3,4 novos casos em 100.000 homens, respectivamente e Brasil com incidência de 1,3 novos casos por 100000 homens (GLOBOCAN, 2022).

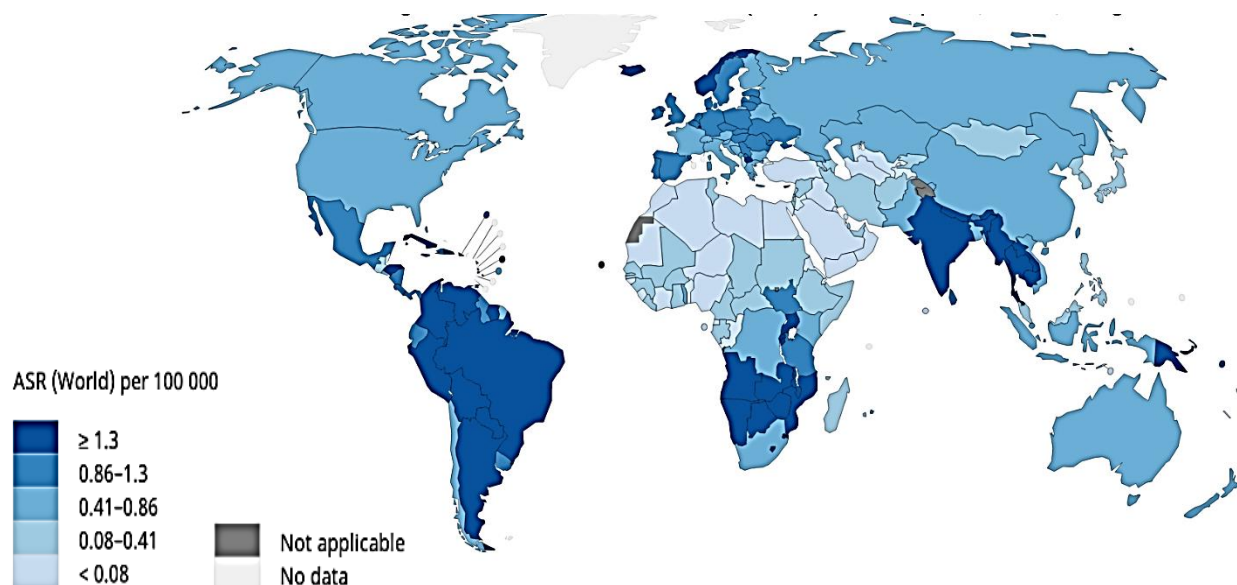


Figura 2. Estimativa da taxa de incidência randomizada por idade (Mundo) em 2020, localização: pênis, sexo: homens, todas as idades. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (<https://gco.iarc.fr/today>).

O continente africano apresenta elevadas taxas de mortalidade em Eswatini, Uganda e Ruanda com 3,5, 2,4 e 1,7 respectivamente e as mais baixas em Cabo verde, Comores e em Mauritânia, todas de valor zero. Segundo o GLOBOCAN (2022), na Europa a taxa de mortalidade, em 2020, foi mais elevada na Região de Montenegro, Macedônia e Polônia, variando de 0,77 a 0,49 a cada 100.000 homens. Curiosamente, aqueles países com maiores incidências apresentam menores taxas de mortalidade, Islândia, Malta e Luxemburgo, todas de valor zero, Figura 3.

No continente asiático, Nepal, Índia e Mianmar apresentam além de maiores incidências, apresentam também a maior mortalidade da região. Os países de tradição mulçumana conhecidos por realizar circuncisão ainda na idade infantil, apresentam baixos valores de novos casos, a saber: Irã (0,11) e Iraque (0,00). Na América do Norte, Canadá e Estados Unidos apresentam baixas incidências, 0,57 e 0,50, respectivamente. Enquanto na América do Sul, Santa Lúcia e Paraguai apresenta estimativa de 3,9 e 3,4 novos casos respectivamente e Brasil com 1,3 novos casos (GLOBOCAN, 2022).

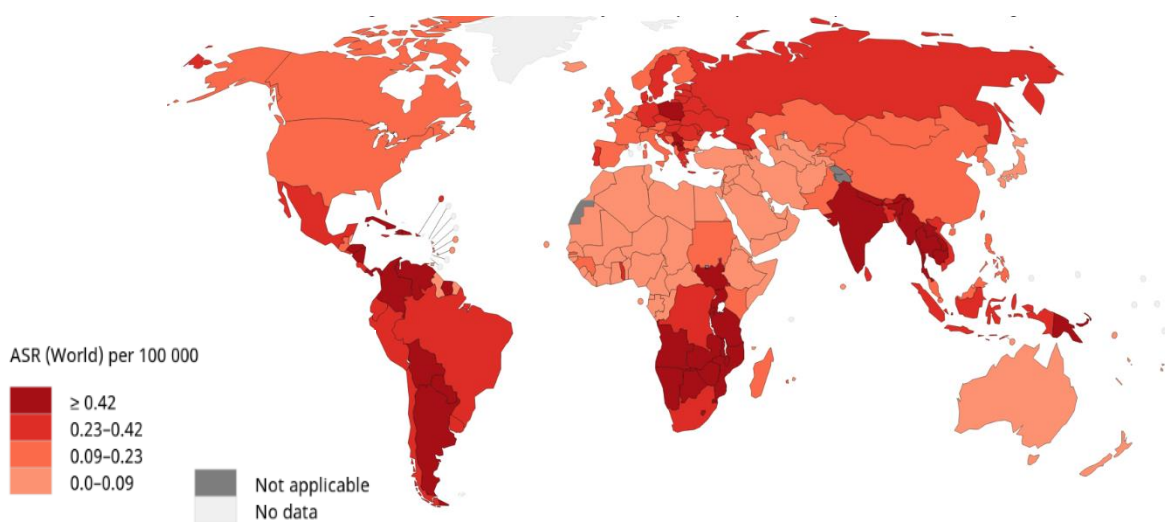


Figura 3. Estimativa da taxa de mortalidade randomizada por idade (Mundo) em 2020, localização: pênis, sexo: homens, todas as idades. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (<https://gco.iarc.fr/today>).

A taxa de incidência e a mortalidade de CaPe considerando o IDH, verificamos que ultrapassa 12.000 novos casos em regiões com IDH médio e a mortalidade chega perto de 6.000 casos, Figura 4. Embora, estejam em regiões de IDH médio, dentro da mesma região geográfica existem características socioeconômicas que podem modular a apresentação de doenças. Dois estudos recentes mostraram associação entre CaPe invasivo e o status socioeconômico diminuído (TORBRAND et al., 2017; SVAHN et al., 2016).

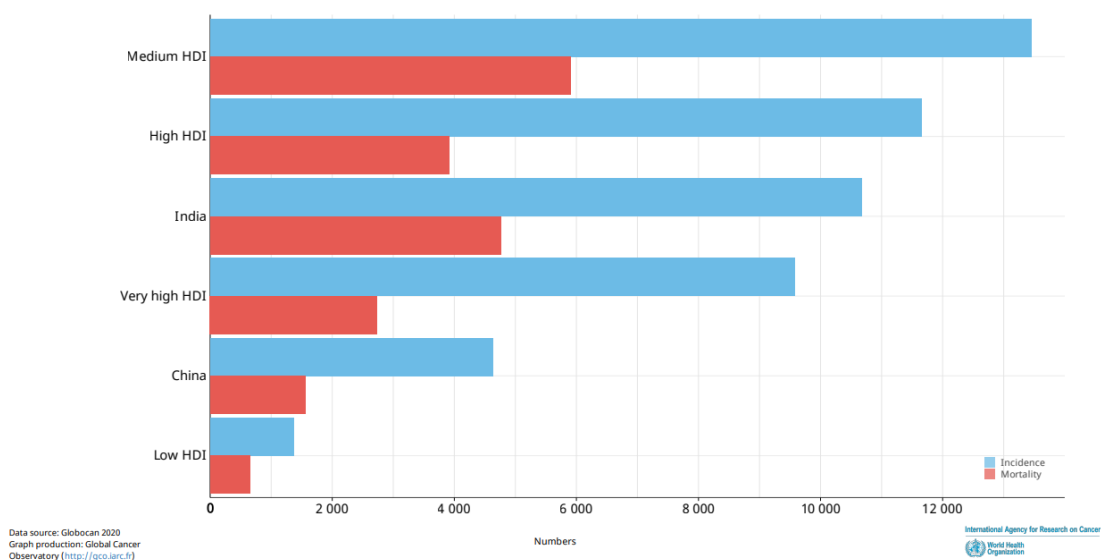


Figura 4. Estimativa da taxa de incidência e mortalidade por CaPe em homens de todas as idades segundo o IDH. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (<https://gco.iarc.fr/today>).

Ao explorar os dados da Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), foi verificado que o número estimado de novos casos e mortalidade, foram superiores a 1500 casos na Índia, China e Brasil, Figura 5 (GLOBOCAN, 2022).

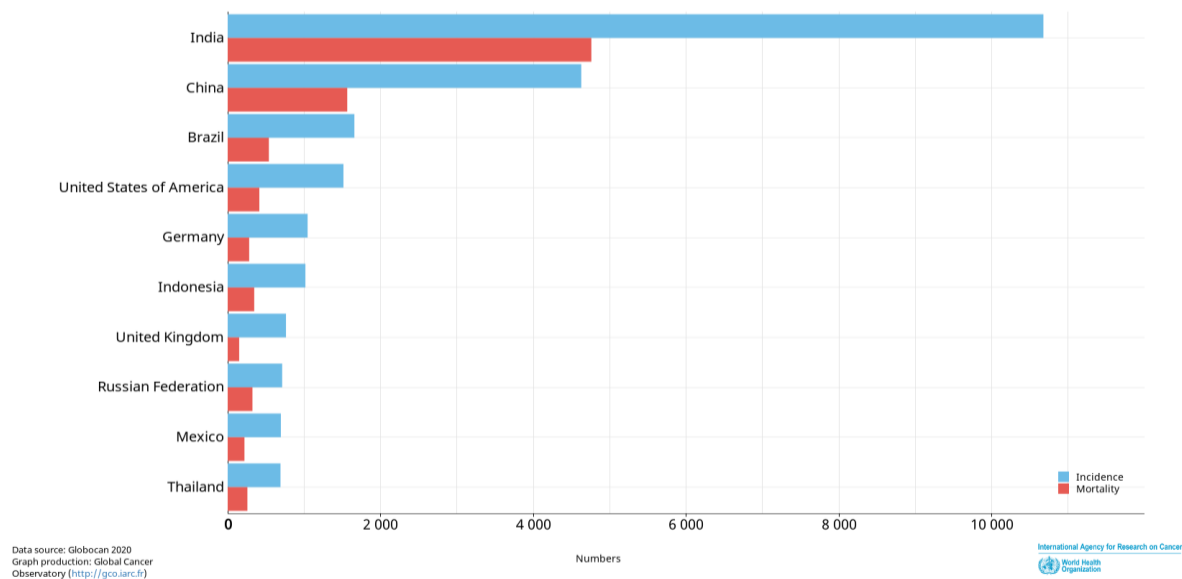


Figura 5. Estimativa da taxa de incidência e mortalidade de CaPe em homens de todas as idades, no mundo. Os dados são do GLOBOCAN, 2022 (<https://gco.iarc.fr/today>).

2.3 Epidemiologia do CaPe no Brasil

A epidemiologia do CaPe no Brasil ainda não está bem estabelecida. O último relatório de incidência do INCa considerou uma estimativa, no ano de 2020, apenas para todas as neoplasias, exceto pele não melanoma, em homens, que varia de 122,51 a 378,88 novos casos a cada 100.000 homens, sendo 4.200 novos casos só no Estado do Maranhão (Figura 6) (INCa, 2020).

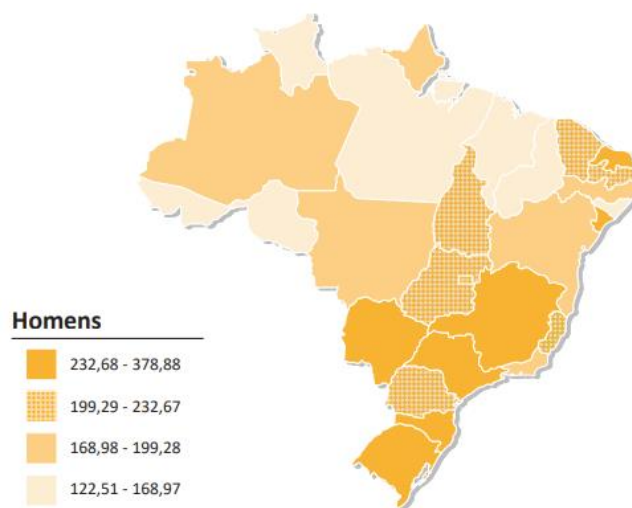


Figura 6. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias, exceto pele não melanoma). Fonte: INCA (2020)

Na avaliação dos dados do Sistema de Informação de Mortalidade, entre 2009 e 2014, foi verificado que ocorreram mais de 2 mil mortes e aproximadamente 3 mil amputações devido ao CaPe no país. (DATASUS, 2022). A prevalência no Norte e Nordeste corresponde a 53% dos casos de todo país, enquanto a incidência mostra que os índices variam de 2,1 a 6,1 novos casos a cada 100 mil homens (Figura 7) (COUTO et al. 2014; COELHO et al. 2018).

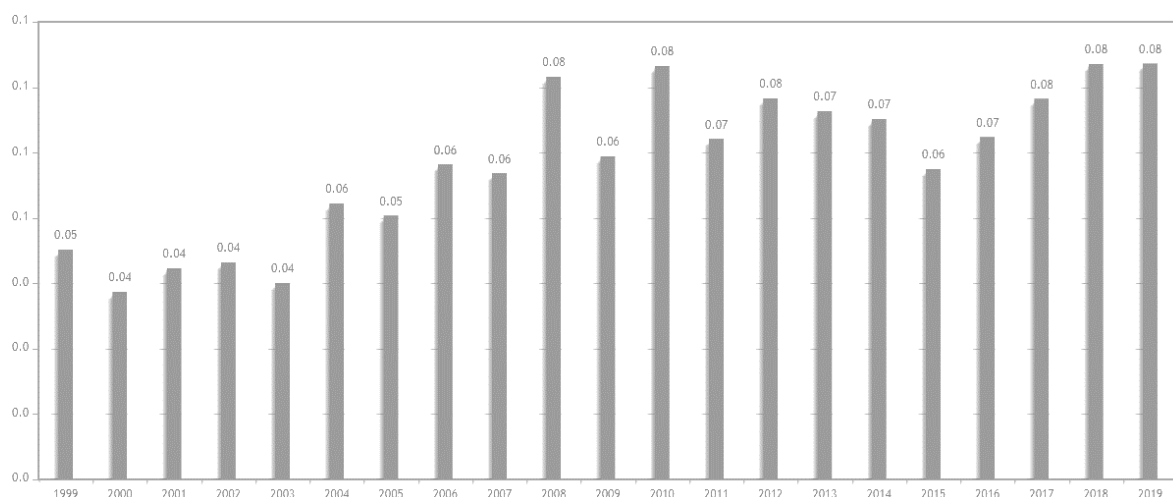


Figura 7. Mortalidade proporcional não ajustada por câncer de pênis, nordeste do Brasil, grupo CID10- 60, de 1999 a 2019. (DATASUS, 2021)

2.4 Fatores socioeconômicos do Maranhão e CaPe

Sabe-se que os fatores socioeconômicos estão estreitamente implicados nos determinantes em saúde e doença (KORKES et al. 2020). Desse modo, para melhor avaliação do processo de saúde -doença as pesquisas devem avaliar também os determinantes coletivos. Assim, é fundamental a compreensão e análise dos fatores relacionados ao desenvolvimento do CaPe remetendo-se ao conhecimento de quais condições socioeconômicas, ambientais e políticas que são determinantes deste processo de saúde-doença em particular. (BUSS, PELEGRINI, 2007).

O índice de desenvolvimento humano, medido pelo PNUD (Programa das Nações Unidas pelo Desenvolvimento), é um indicador essencial nesse sentido pois inclui dados sobre renda, escolaridade e fertilidade de uma região. O Maranhão, segundo o último levantamento de 2013 divulgado pelo IPEA (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada) e o PNUD, apresentou IDH de 0,639 (IBGE, 2010). O Estado tem a capital São Luís com IDH na 249ª posição do ranking nacional e vários municípios com os menores IDH do país, sendo Marajá do Sena com IDH 0,418 (5565ª posição no ranking), Figura 8. Esse cenário reforça indicadores negativos que estarão implicados no diagnóstico e prognóstico do CaPe (IBGE, 2010).

NO MARANHÃO	IDH	NO BRASIL	IDH
1°São Luís	0,768	1°São Caetano do Sul - SP	0,862
2°Imperatriz	0,731	2°Águas de São Pedro - SP	0,854
3°Paço do Lumiar	0,724	3°Florianópolis - SC	0,847
4°São José de Ribamar	0,708	4°Balneário Camboriú - SC	0,845
5°Balsas	0,687	4°Vitória - ES	0,845
...		...	
213°Água Doce do Maranhão	0,500	249°Bilac - SP	0,768
214°Satubinha	0,493	249°Resende - RJ	0,768
215°Jenipapo dos Vieiras	0,490	249°São Luís - MA	0,768
216°Marajá do Sena	0,452	...	
217°Fernando Falcão	0,443	265°Avaré - SP	0,767
		265°Serra Negra - SP	0,767
		...	
		5560°Chaves - PA	0,453
		...	
		5562°Marajá do Sena - MA	0,452
		5563°Atalaia do Norte - AM	0,450
		5564°Fernando Falcão - MA	0,443
		5565°Melgaço - PA	0,418

Figura 8. Comparativo do IDH entre municípios no Maranhão e com os demais Estados do Brasil.

Estudos de caracterização sociodemográfica realizados no Maranhão apontam determinantes sociais no grupo de homens com o diagnóstico de CaPe. O estudo de Martins et al., (2018) caracterizou um perfil de pacientes (n=50) atendidos no Estado do Maranhão onde a maioria eram lavradores, tinham baixo nível de escolaridade e eram fumantes. Esses aspectos podem ter influenciado o fato de a maioria destes pacientes ter iniciado o acompanhamento médico já em estadiamento com alto potencial metastático (80% com estadiamento T tamanho-Nódulo-Metastase-pT1b-pT3). Um outro estudo com amostras do Maranhão (n=50), também detectou a maioria dos pacientes com estadiamento T2 e T3 e, mostrou que nessa amostra de estudo alguns tumores

expressaram miR-107 e essa molécula estava associada a uma menor sobrevida livre da doença e sobrevida global (PINHO et al., 2020).

Um outro estudo fez uma caracterização mais ampla ao analisar 116 casos de CaPe e verificou que a maioria residia na zona rural, trabalhava na lavoura, tinha baixa ou nenhuma escolaridade (VIEIRA et al. 2020). Ainda nesse estudo, com relação aos hábitos de vida, a maior parte tinha higiene genital ruim/moderada com histórico de infecções sexualmente transmissíveis e zoofilia. A multiplicidade de parceiros foi detectada em 75% (>6 parceiros sexuais) (VIEIRA et al. 2020).

Outro fator que demonstra a problemática decorrente de uma menor adesão do homem a política de promoção da sua saúde foi que o tempo médio para busca ao tratamento foi de 18,9 meses após a apresentação dos primeiros sintomas, e ainda, demonstrou a presença de DNA viral em 62% dos pacientes e doença em estágio $\geq T2$ em 84% dos casos. Essa caracterização demonstra a vulnerabilidade da população do Estado e a necessidade de políticas específicas para o diagnóstico/tratamento e além disso, investimento em pesquisas científicas relacionadas ao CaPe (VIEIRA et al. 2020).

Somado a tudo isso, a pandemia trouxe problemas mais complexos para o diagnóstico e tratamento do CaPe. Assim, segundo o estudo de Casco et al., (2020) para o sucesso no atendimento a pacientes com diagnóstico de CaPe, nesse contexto ocasionado pelo Sars-Cov2, é necessário uma logística sistêmica, integrada, com estratégias de busca ativa para promover as políticas voltadas para a saúde do homem. Nesse estudo, os autores reforçam que a avaliação inicial e encaminhamento para terapêutica adequada é obrigatório e inadiável, podendo ocorrer telemonitoramento após procedimento cirúrgico (CASCO et al. 2020) o que não ocorre em locais menos desenvolvidos.

2.5 Fatores de Risco para o CaPe

Existem poucas evidências epidemiológicas com número de participantes satisfatório que avaliem a epidemiologia do CaPe e seus fatores de risco. A seguir foram compilados alguns dados:

2.5.1 Fimose, Circuncisão e CaPe

A fimose é caracterizada pela incapacidade ou dificuldade acentuada para retrain o prepúcio. Já a circuncisão é um procedimento de remoção da pele que reveste a glândula peniana, e através desse processo é possível diminuir a prevalência de várias infecções, inclusive pelos subtipos virais de alto risco de HPV. Em 2020, um estudo realizado na África, mostrou que as taxas de infecção pelo HPV foram comparáveis às demais populações circuncizadas e reduziu o risco de infecção pelo HPV em jovens de 18 a 28 anos circuncidados na infância (BACKES et al., 2020), assim como na Europa, no estudo de Hebnes et al. (2021). Ainda, foi notificada baixíssima frequência de CaPe em locais em que há programas de circuncisão na infância, como áreas islâmicas e Israel, e, também, em outras regiões em que esse procedimento se mostrou como forte fator de proteção ao desenvolvimento da neoplasia (LARKE et al., 2011).

No Brasil a circuncisão na infância não é um procedimento obrigatório. O estudo de Martins et al. (2020), no país, mostrou que pacientes, circuncizados na idade adulta, que tinham fimose, tiveram 11 vezes mais chance de superexpressão de um marcador de câncer invasivo p16INK4a [OR = 11 (IC95% 1,1–109,7); p = 0,04]. Dessa forma, corroborando denotando ao processo de circuncisão na infância uma importante política a ser estabelecida, já que o procedimento realizado na fase adulta não confere proteção ao desenvolvimento da neoplasia (MORRIS et al., 2017).

2.5.2 Idade e CaPe

As políticas de promoção da saúde do homem visam resguardar a integralidade da atenção, assim, alguns dispositivos discorrem especificamente aos cuidados para o período da idade acima de 60 anos. Acredita-se que a idade >60 é motivador de busca a atendimento médico mediante casos irreversíveis por não terem usado métodos de prevenção ou tratamento precoce, enquanto na adolescência e idade adulta, ocorre menor busca ao atendimento, mesmo esse grupo sendo caracterizado por se expor mais aos fatores de risco sem uso de prevenção adequada (BRASIL, 2008).

Doenças crônicas, como o câncer, têm sido frequentemente relatadas com o avanço da idade (>60 anos), porém estudos mais aprofundados nessa população são limitados. No contexto do tumor, tem sido notado que o envelhecimento promove o acúmulo de danos no DNA dependente do tempo, alterações que englobam alterações biofísicas na matriz extracelular, alterações em fatores secretados e alterações no microambiente tumoral (fibroblastos e células imunes de perfil imunossupressor)

(ROZHOK; DEGREGORI, 2019). A atividade protumoral pode ser explicada por que na senescência, as células aumentam a secreção de mediadores inflamatórios como metaloproteinases (MMP, invasão tumoral), fatores de crescimento-EGFR (crescimento), fatores de crescimento vascular (VEGF, angiogênese), gerando um secretoma, definindo o fenótipo secretor associado a senescência (SASP) (COPE et al., 2010).

A nível mundial a idade média do diagnóstico de CaPe está próximo dos 55 anos, entretanto algumas regiões apresentam médias menores ainda. No continente asiático, de acordo com o estudo de Sirithanaphol et al., 2020, na região da Tailândia entre os 70 pacientes analisados a média de idade observada foi de 54,2 anos e, nesse estudo, a idade reduzida estava associada com estágio localmente avançado (Sirithanaphol et al., 2020). Na Korea, Kwon et al., (2019) mostraram uma média de idade ao diagnóstico de 60 anos, enquanto no Japão, um estudo em base de dados (N=1012), essa média foi ainda mais elevada, 74 anos (Tanaka et al., 2020).

Na Europa, países como Holanda e Italia apresentaram média em torno de 58 anos (HOEKSTRA et al., 2019; de ROSE 2019). Na África, a cidade de Marrocos apresentou uma média de 58,1 anos. Nos EUA, por sua vez, a média observada foi de 69 anos (MULHERKAR et al., 2019). Já no Brasil, embora a média de idade siga a tendência mundial, em algumas regiões, é cada vez maior o número de casos de homens jovens com diagnóstico de CaPe. Na amazonia a média observada foi de 57,4 anos (faixa 20-90 anos), já no Maranhão a média encontrada foi de 61 anos, com faixa entre 23 a 103 anos. (MARTINS et al., 2020; MACEDO et al., 2020)

2.5.3 Tabagismo e CaPe

O entendimento de como os fatores de risco estão implicados entre si é fundamental para planejar prevenção ou avaliar o melhor prognóstico da doença. O tabagismo foi associado a maiores chances de detecção de HPV em homens (HEBNES et al., 2021). Além disso, acredita-se que os carcinógenos presentes no cigarro estimulem mutações em genes de controle do ciclo celular ou reparo do DNA. Já é descrita, por exemplo, a ação direta de seus componentes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHAs) ou seus metabólitos na indução de mutações no gene TP53. A nicotina, por sua vez, substância frequente nos cigarros, embora não seja carcinogênica, tem potencial viciante e, por isso, promove maior exposição dos carcinógenos no usuário (PFEIFER et al., 2002).

Embora uma associação do câncer com o tabagismo seja comumente observada, o papel exato que o tabagismo desempenha no desenvolvimento desta doença permanece desconhecido. Existe uma associação entre homens que fumavam e o diagnóstico de CaPe, tanto *in situ* quanto invasivo. Um estudo retrospectivo realizado com 117 homens com CaPe, em Portugal, apresentou 23,4% tabagistas (DIAS et al., 2017). No Brasil, um importante estudo realizado em dois centros de referência em oncologia mostrou que 48,9% dos pacientes eram tabagistas e 50% de todos os casos estavam em estadiamento T2 (COUTO et al., 2014). No Maranhão, outro estudo demonstrou que pacientes com CaPe, HPV e exposição ao tabaco tendem a apresentar estadiamentos mais elevados, e das 55 amostras avaliadas, 65,5% eram de fumantes ou ex-fumantes (ABREU et al., 2020)

2.5.4 A infecção pelo HPV e CaPe

A infecção persistente pelo HPV é fator importante na carcinogênese peniana, a patogênese do CaPe é considerada como dependente da infecção pelo HPV e independente da infecção pelo HPV. O HPV foi encontrado no escroto e partes externas do pênis (glande, corpo, prepúcio), e com uma inferior prevalência na uretra, ducto deferente, epidídimo e testículo. Em uma coorte de homens japoneses com uretrite, a prevalência de HPV foi semelhante à da glândula (20% vs 31%) (SHIGEHARA et al., 2010)

O HPV causa a infecção mais comum do trato reprodutivo, com mais de 80% dos adultos sexualmente ativos infectados por um HPV pelo menos uma vez na vida. Mais de 40 tipos de HPV são sexualmente transmissíveis e infectam mucosas genitais ou o ânus. As infecções por HPV geralmente são eliminadas pelo sistema imunológico dentro de alguns meses após a infecção. No entanto, HPV de alto risco oncogênico (principalmente os subtipos 16 e 18) podem persistir no tecido e as células transformadas gerar o câncer nas mucosas genitais do colo de útero (>99%), ou anal, ou do pênis (PALESFKEY, 2010).

De forma breve, o ciclo viral inicia quando o HPV acessa as células basais do epitélio escamoso à medida que ocorrem microfissuras no epitélio. Após essa entrada na célula, o vírus utiliza os componentes da célula hospedeira para expressão das proteínas estruturais da região precoce E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7 e gerar a replicação do DNA episossomal na camada suprabasal. Em resposta, o sistema imune produz anticorpos específicos para essas proteínas que desempenham neutralização do vírus enquanto ele reside na membrana basal. O HPV não confere o ciclo lítico à célula hospedeira e pode

permanecer como uma infecção crônica assintomática, com cópias episômicas de seu genoma no núcleo da célula, enquanto isso as partículas virais são liberadas com células descamativa (LAMY et al., 2012; MILLER et. Al, 2013).

A persistência viral culmina com a integração do DNA do HPV no material genético da célula hospedeira. Logo em seguida a esse evento, ocorre superexpressão de das oncoproteínas e consequente transformação celular. A oncoproteína E7 altera o feedback negativo da proteína do retinoblastoma (pRB), modificando a expressão de P16 INK4A, que se apresenta superexpressa e atuando no descontrole do ciclo celular. Enquanto a superexpressão da oncoproteína viral E6 inativa a proteína supressora de tumor p53, levando a uma interrupção do reparo do DNA, interrupção do crescimento e apoptose. Fora descrito, ainda, que E6 promove atividade antiapoptótica e imortalização celular por ativação da via da telomerase induzida por c-myc e expressão de transcriptase reversa (hTERT) (LAMY et al., 2012; MILLER et. Al, 2013), Figura 9.

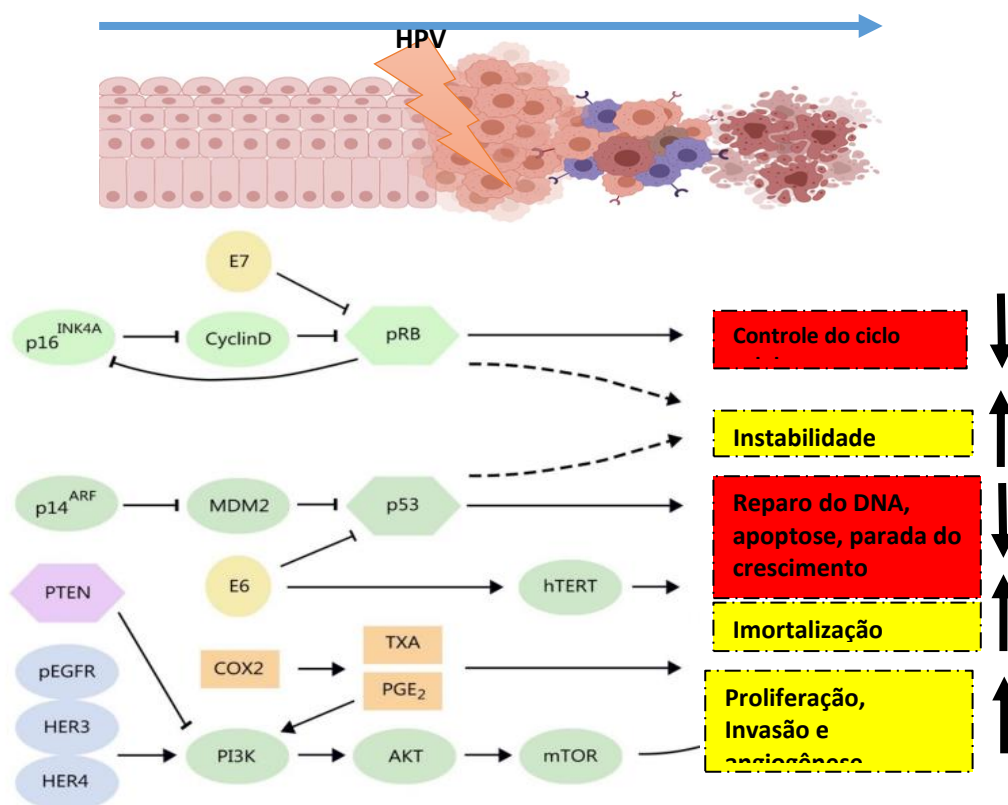


Figura 9. Processo de oncogênese dependente das oncoproteínas virais. Fonte: adaptado de VANTHOOR et al. (2021), com figura criada no Biorender.com.

Em nível molecular esse é o mecanismo mais bem descrito sobre a oncogênese peniana, no entanto, também é esperado que, na modificação da estrutura tecidual nesse espectro que vai de lesões intrapetileais precursoras ao câncer, outros importantes componentes devem estar associados a esse processo, tais como moléculas diversas e células da resposta imunológica, queratinócitos, fibroblastos associados e miRNAs (BOGUSLAWSKA et al. 2019; Pekarek et al. 2022). Micropartículas, ou microvesículas, são pequenas partículas de membrana liberadas pelas células que podem exercer efeitos sobre outras células tanto em nível local quanto sistêmico. Foi verificado um aumento nas micropartículas liberadas de queratinócitos humanos ou de camundongo que expressam a oncoproteína HPV16 E7, comparado com queratinócitos de controle (ZHANG et al., 2018).

Além do mais, a E7 expressa nessas micropartículas suprimiu a resposta das células T citotóxicas. Este é um achado importante, sugerindo que Microvesículas de células infectadas pelo HPV podem suprimir a resposta das células T regulando células dendríticas epidérmicas (LCs), potencialmente contribuindo para a persistência da infecção pelo HPV e câncer (ZHANG et al., 2018). A compreensão dessa interação entre células e moléculas pode melhorar o entendimento da carcinogênese peniana e ainda fornecer importantes possibilidades terapêuticas.

2.5.5 Inflamação e CaPe

A inflamação crônica predispõe o indivíduo a câncer e é atribuída contribuição em torno de 20-30% na carcinogênese. Quando avaliados aspectos imunológicos na composição do tecido íntegro do pênis, o nível de queratinização e a espessura do epitélio variam entre as diferentes mucosas, prepúcio, meato uretral, fossa navicularis e, juntamente com o muco, constituem a primeira linha de defesa a invasões virais potencialmente transmitidas durante a relação sexual (GREETEN et al., 2019).

Em homens circuncizados, o epitélio queratinizado da glândula anteriormente coberta pelo prepúcio torna-se um epitélio seco, e acredita-se ser mais resistente à microabrasão, que por sua vez pode limitar a exposição viral de células-alvo localizadas dentro e abaixo das camadas do epitélio. Várias pequenas glândulas uretrais (chamadas glândulas de Littre) brotam ao longo do epitélio da uretra peniana e secretam um muco que funciona como barreira imunológica contra patógenos invasores devido à presença de imunoglobulina A (IgA) secretada, IgG, IgM também são secretadas pelo epitélio da

uretra, juntamente com IFN tipo 1, mucinas e peptídeos antimicrobianos (AMPs), Figura 12 (TORTOREC et al., 2020).

Além disso, ao longo da estratificação dos epitélios escamosos do pênis, existem numerosas células de Langerhans (DCs epidérmicas), mas poucos macrófagos. Os linfócitos T, em sua maioria células CD8+, são encontrados no epitélio da glândula, prepúcio e meato. Em contraste com outras partes do pênis, não há DCs na coluna mucosa da uretra, mas muitos macrófagos, bem como linfócitos T CD8+, Figura 10.

Na lâmina própria do prepúcio ocorre predominância de macrófagos, CD8+ de memória e alguns T CD4+ auxiliares do tipo 17 (ANDERSON et al., 2011). A lâmina própria da uretra peniana contém numerosos linfócitos T, essencialmente células T CD8+ de memória com alguns CD4+ *naive* (não primadas) e células T de memória (a maioria CD103+), natural killer CD56+ (NK), memória B (CD19+) e plasma produtor de IgA e IgM células, mas apenas alguns macrófagos.

Além da uretra, células B de memória e IgA e JN plasmócitos são encontrados na glândula e fossa navicular mucosa, mas são raros no meato. Em comparação com a uretra e a fossa, a glândula contém um número maior de células NK que são mais ativadas, assim como um número maior de células CD8+ efectoras (TORTOREC et al., 2020).

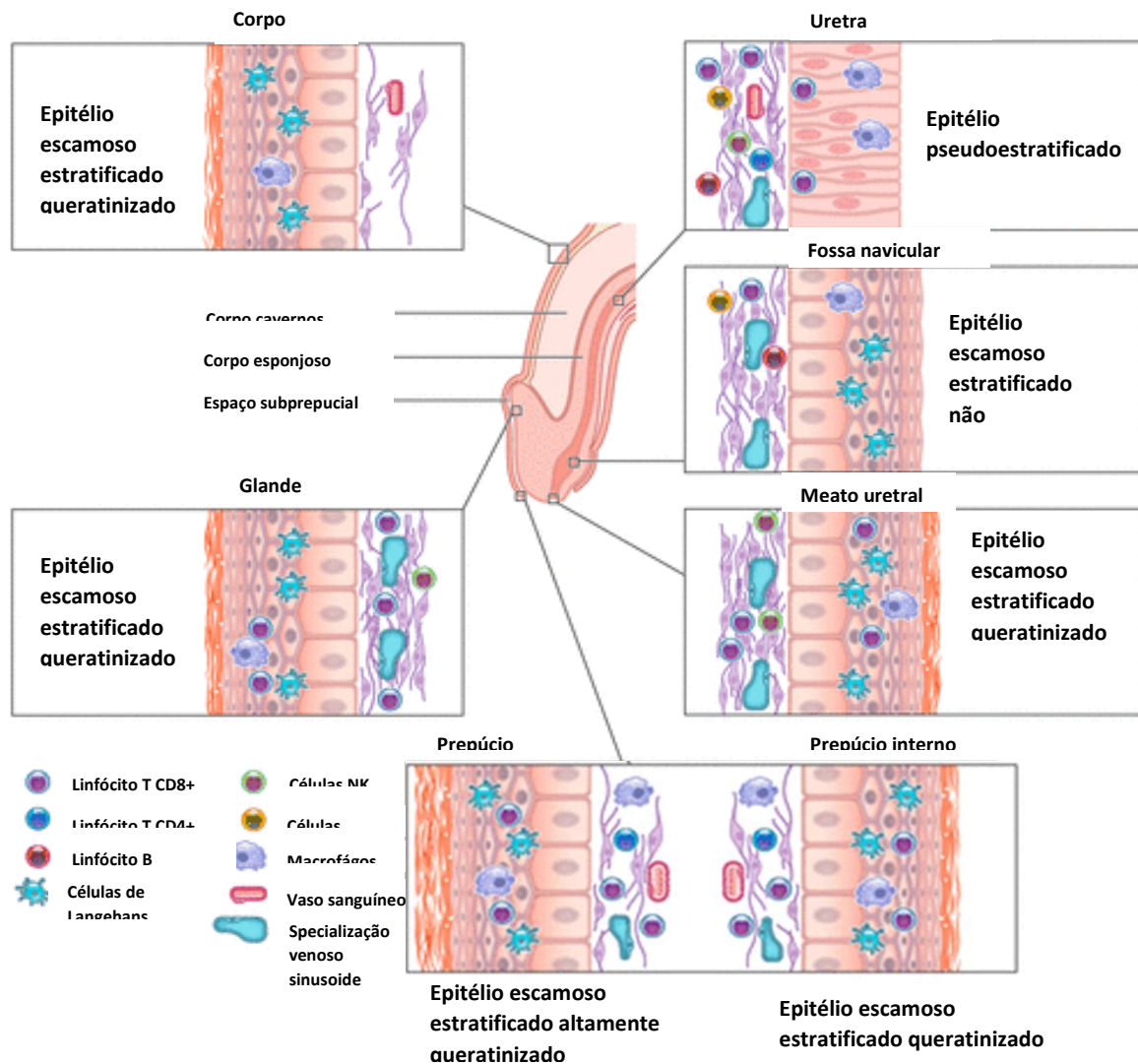


Figura 10. Anatomia peniana e distribuição dos componentes teciduais e imunológicos em condição de homeostasia. (Adaptado de TORTOREC et al., 2020)

Esse estágio de homeostasia pode ser quebrado por diversas causas e afeta a interação entre esses componentes levando a inflamação. O liquen escleroso é um processo inflamatório inicialmente benigno de etiopatologia desconhecida, mas amplamente associado como cofator do processo de carcinogênese peniana, uma vez que predispõe o tecido a presença de esmegma e curso prolongado de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) (KULKARNI et al., 2009; PUGLIESE et al., 2007). O liquen foi reportado em 45% dos pacientes com CaPe, quando comparados com controle (MINHAS et al., 2010). Esse processo se caracteriza com a apresentação de placas brancas que podem evoluir para placas escleróticas, apresentando também hemorragia, bolhas, erosões e fissuras na região peniana. É necessário acompanhamento regular para avaliar a presença de úlceras ou presença de HPV concomitante (CALMON et al., 2011).

No geral, o processo inflamatório é ativado inicialmente mediante um estímulo e envolve a liberação de citocinas e quimiocinas, que ativam a resposta imune inata, seguida da resposta adaptativa. Após o reparo tecidual e remoção do estímulo, com o objetivo de controlar a resposta imune, a inflamação é desativada, entretanto, se o estímulo persistir, a inflamação se torna crônica e, desse modo, está fortemente associada a malignização celular (HUYNH et al., 2019).

Alguns dados mostram que essa transformação celular pode ser decorrente da ação dos Padrões moleculares associados a danos (DAMPs) resultantes da fagocitose ou outros detritos como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que causam danos ao DNA já danificados pelos leucotrienos e prostaglandinas (PGE), moléculas derivadas de ácidos graxos produzidas no contexto inflamatório, mantendo a inflamação e promovendo o desenvolvimento neoplásico (HUYNH et al., 2019).

Na inflamação reparativa, a resposta imune aguda recruta neutrófilos, monócitos e macrófagos para garantir o processamento antigênico e a morte do microorganismo, seguido de resposta adaptativa e apoptose celular. Nesse processo, fibroblastos invasores facilitam a formação de tecido de granulação e a angiogênese antes da reepitelização e a remodelação da matriz extracelular (MEC) para retornar à homeostase do tecido basal (Figura 11) (HUYNH et al., 2019).

Esses dados mostram o quão complexo é a interação e essa retroalimentação. Na inflamação crônica e presença de DAMPs, os níveis persistentes e elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) levam a acúmulo de danos no DNA, esses danos por sua vez atuam no processo de progressão tumoral e em seguida induz maior expressão de moléculas que favorece a manutenção de uma inflamação não resolutive, por sua vez crônica (HUYNH et al., 2019).

Além disso, a influência do genoma microbiano ou fatores epigenéticos medeia sinais autócrinos e parácrinos que estão associados a inflamação crônica, infecção persistente e câncer. O estado de inflamação crônica é um dos mecanismos mais bem descritos para o desenvolvimento do CaPe, uma vez que o gene supressor de tumor, p16, desempenhe um papel crucial na patogênese do CaPe através da perda da capacidade de induzir apoptose em células com múltiplos danos no DNA (PROTZEL; SPIESS, 2013)

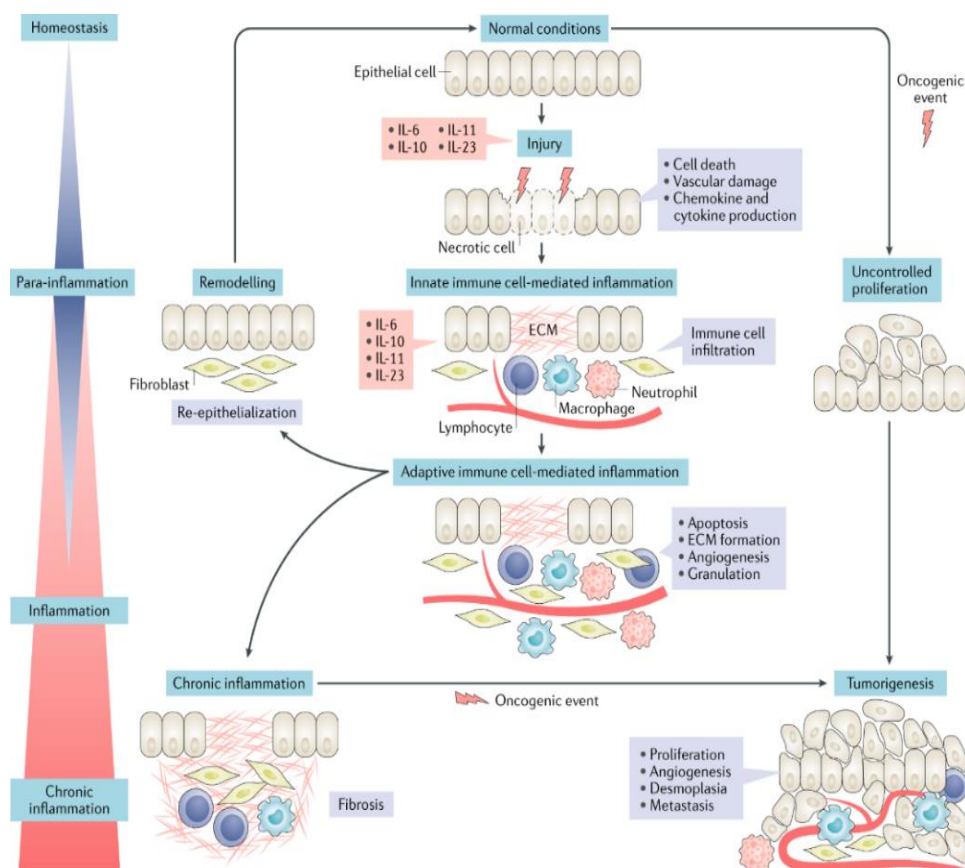


Figura 11. Processo de cicatrização e associação com neoplasia (Fonte: HUYNH et al., 2019).

Como mencionado anteriormente, no ambiente inflamatório, é imprescindível ocorrer plasticidade celular necessária para os processos reparadores, essa atividade, por sua vez, é amplamente sustentada por uma reação parainflamatória de baixo grau, dependente de citocinas, que serve como um condutor reversível, ativando o transdutor de sinal e o ativador da transcrição 3 (STAT3) nos vários tipos de células envolvidas (Figura 12) (FAN, MAO, YANG 2013; HUYNH et al., 2019)

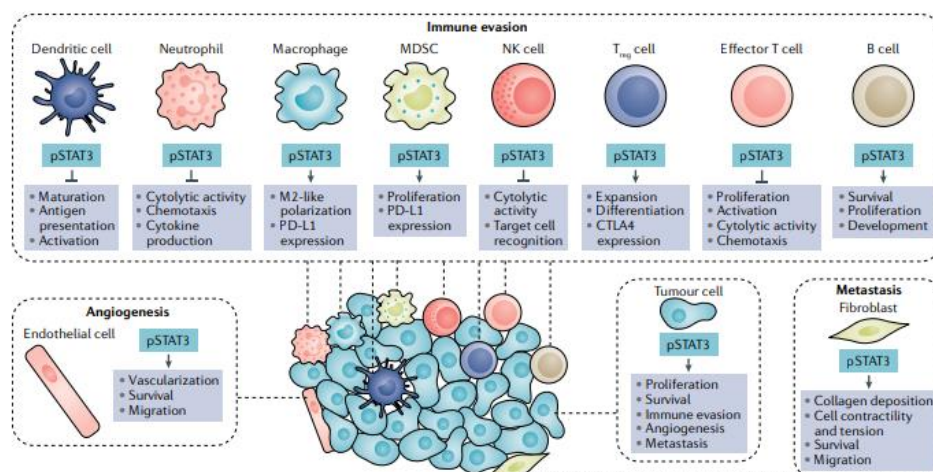


Figura 12. O papel do STAT3- no processo de oncogênese (HUYNH et al., 2019)

A inflamação descontrolada pode alterar os programas de diferenciação para reter estados semelhantes a células-tronco, resultando em fibrose e na produção de intermediários reativos e eventos mutacionais associados. Da mesma forma, mutações oncogênicas podem desencadear uma resposta inflamatória de baixo grau que promove e sustenta neoplasias emergentes e conduz sua progressão para câncer metastático. (HUYNH et al., 2019)

No contexto da resposta imunológica no microambiente tumoral, esse fator ativador de transcrição faz com que neutrófilos, células assassinas naturais (NK-CD56+) e linfócitos TCD8+ apresentem resultados imunossupressores e limitantes (LEE et al., 2019; HUYNH et al., 2019).

Ainda, a atividade de STAT3 é verificada em células dendríticas infiltradas no microambiente tumoral, essas APCs são essenciais para a comunicação da imunidade inata e adaptativa, além de, em um cenário favorável, modular um perfil de resposta mais efetiva. Evidências mostram que a atividade de STAT3 nas DCs compromete a maturação (inibindo expressão de CD80, CD86) e ativação (diminui a produção de IL-12) e diminui apresentação do antígeno antitumorais (inibindo moléculas de classe II) (HUYNH et al., 2019).

Além da superexpressão de STAT3, outra maneira de prejudicar/regular a capacidade da célula dendrítica seria pela ação de múltiplos miRNAs como miR-16-1 e miR-155, que são regulados positivamente nas DCs por diversos tipos de câncer (cervical, ovariano, mama, melanoma, pulmão e câncer peniano relacionado ao HPV), os quais produzem e secretam vesículas com essas moléculas e apresentam efeitos diversos na diferenciação e maturação da DC (HUYNH et al., 2019; HARDEN et al., 2017).

Concomitante a suas atividades, STAT 3 ainda auxilia o fator de transcrição NF- κ B na ativação de vários genes. Ambos, interagem em diversos níveis e regulam a expressão e função de inúmeras citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores de sobrevivência. Assim, esses fatores de transcrição têm sido associados a muitas doenças crônicas, incluindo inflamação e câncer. A ativação do NF- κ B é importante no início da carcinogênese induzida por DNA danificado, e também se apresenta restringindo as respostas imunes antitumorais de perfil Th1 e aumentando a proliferação e sobrevivência de células tumorais, bem como a angiogênese e metástase do tumor (LIU et al., 2017), Figura 13.

NF- κ B vem sendo bem descrito e é indispensável para a progressão maligna de células transformadas associadas com várias células inflamatórias e uma rede de sinalização de moléculas. Em condições sem estímulo de patógenos ou dano tecidual, o NF- κ B do citoplasma é inibido por I κ B, quando essas quinases são ativadas por patógenos ou citocinas inflamatórias o inibidor é, então, fosforilado e degradado deixando o fator nuclear livre para ativar genes envolvidos na resposta imune (LIU et al., 2017).

Além disso, o aumento da atividade do NF- κ B está associada a muitos tipos de câncer cuja indução seja por infecções virais. A atividade de NF- κ B é modulada por muitos vírus diferentes, como vírus da imunodeficiência humana 1(HIV-1), vírus linfotrópico T humano 1(HTLV-1), vírus Epstein-Barr, vírus da hepatite B, adenovírus e HPVs (CHANG, MOORE, WEISS, 2017). Ainda, evidências mostram que a proliferação de células dependente de NF- κ B e a proteção contra a apoptose provavelmente têm efeitos sobre a oncogênese associada a infecções por HPV.

São conhecidas duas principais vias de ativação do NF- κ B, a clássica e a alternativa. A via clássica é ativada de forma rápida e transitória por citocinas pró-inflamatórias, PAMPs e DAMPs que atuam via receptores específicos e moléculas adaptadoras (NEWTON, DIXIT, 2012). A ativação da via alternativa é consideravelmente mais lenta, pois depende da síntese *de novo* da quinase indutora de NF- κ B (NIK; também conhecida como MAP3K14), é ativada por linfotoxina (LT), receptor ativador do ligante NF- κ B (RANKL), ligante CD40 (CD40L) e fator de ativação de células B da família TNF (BAFF) (SUN, 2017; VALLABHAPURAPU et al., 2008).

Enquanto a via clássica visa principalmente dímeros p50–p65 (codificado por *RelA*), a via alternativa resulta na ativação de dímeros p52–RelB. Os Alvos típicos para a sinalização clássica de NF- κ B incluem genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (como TNF, IL-1 e IL-6), fatores de crescimento (como fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF)), quimiocinas (incluindo IL-8 (em humanos), ligante 1 de quimiocina CXC (CXCL1; também conhecido como KC em camundongos), ligante 3 de quimiocina CC (CCL3; também conhecido como MIP1 α), CXCL2, CCL2 e CCL5, metaloproteínas de matriz (MMPs; como MMP9), proteínas pró-proliferativas (como ciclina D1 e MYC), proteínas anti-apoptóticas (como BCL-X_L, BCL-2 e FLIP) enzimas pró-inflamatórias (como ciclooxigenase 2 (COX2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fatores angiogênicos (como como fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF)), moléculas de adesão (como molécula 1 de adesão celular vascular (VCAM1), molécula 1 de adesão intercelular (ICAM1) e E-selectina) e inibidores da sinalização de NF- κ B (como I κ B α e A20) (LIU et al., 2017).

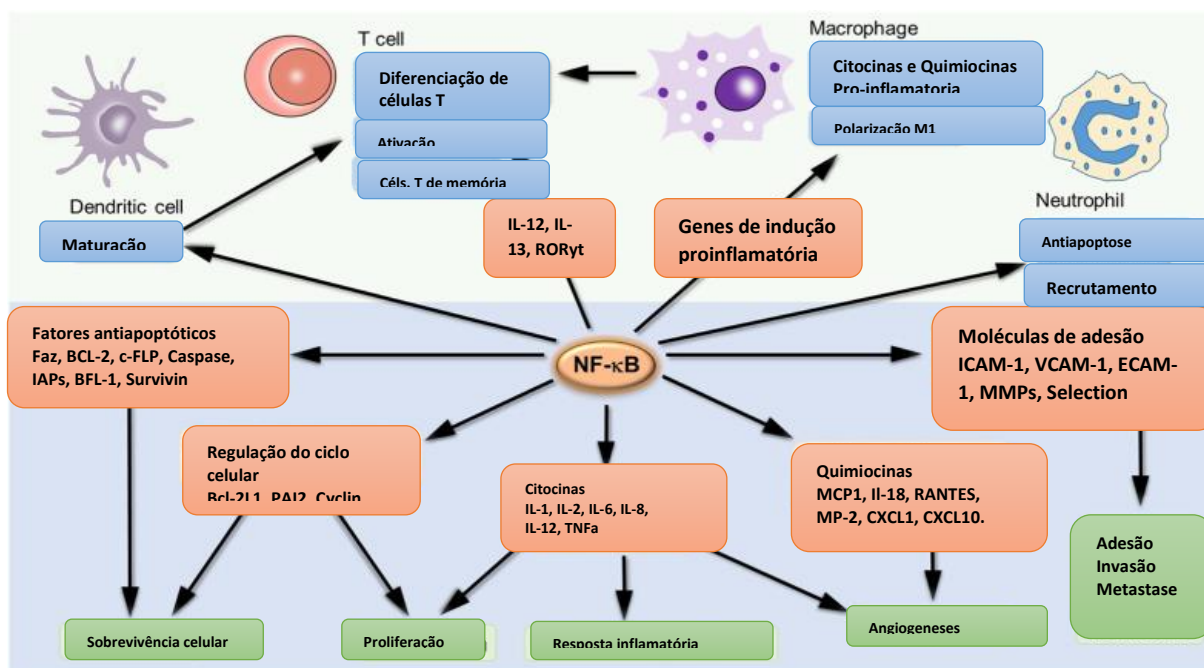


Figura 13. Genes alvo de NF- κ B envolvidos no desenvolvimento e progressão da inflamação (adaptado de LIU et al., 2017).

Na imunidade inata, NF- κ B atua no repertório de receptores do TLRs e padrão de reconhecimento de patógenos (PPR), ligantes de TLRs ativam adaptadores que ativam complexos dependentes de IKK β canônicos, degradação de I κ B α e I κ B β , e liberação de, principalmente, RelA e c-Rel contendo complexos NF- κ B. O NF- κ B regula a inflamação ativando a transcrição de citocinas e quimiocinas, a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais que permitem o extravasamento de leucócitos da circulação para o local da infecção (ECK et al., 1993; CATLEY et al., 2003). Ainda, NF- κ B é importante para sobrevivência do neutrófilos na lesão, induz a produção de prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, leucotrienos e regula metaloproteinases (MMP) da matriz extracelular importantes para o reparo tecidual (LAI et al., 2003). Na Imunidade Adaptativa, acredita-se que ocorre a ativação de NF- κ B a jusante de BCR e ligação de TCR ao peptídeo restrito ao MHC facilitando a proliferação de linfócitos antígeno específico e maturação em células efetoras (HAYDEN et al., 2006; WEIL et al., 2003).

Além do mais, o NF- κ B modula a resposta imune visto que pode estar relacionado tanto com início de um processo inflamatório, na indução desses receptores TLRs ou na

maturação de células da imunidade inata, bem como implicado na homeostase imunológica e tolerância, quando verificada seu papel por meio da sinalização de DCs migratórias de estágio estacionário (BARATIN et al, 2015; GHISLAT et al., 2021). No estudo de Baratin et al (2015) foi mostrado que a assinatura de genes de DCs migratórias que promovem a homeostase tecidual estavam mais significativamente associadas ao fator NF- κ B, e que este, intrigantemente, controla a maturação dessa DC por uma nova rede de genes que é distinta de sua função na maturação das DCs durante o curso da inflamação ou infecção. Na inflamação crônica e no câncer, DCs exibem falhas fisiológicas que promovem um ambiente imunossupressor em favor da progressão tumoral.

Outro evento importante dentro do processo inflamatório crônico é que as DCs podem ativar perfil de células Th17 que produzem IL17 e células T regulatórias (Treg), estimulas por IL-6 e pelo fator de transformação de crescimento β (TGF- β), ou pelo receptor de ácido retinóico-ROR γ t presente nesse ambiente (KIMURA, KISHIMOTO, 2010; WANG et al 2014). No microambiente tumoral, a diferenciação de Th17 e o aumento nos níveis de IL-17, ROR γ t e STAT3 podem ser regulados quando tumores superexpressam o miRNA-155, o qual inibe a expressão do gene alvo SOCS1, que seria o importante inibidor de STAT3 (ZHANG et al., 2018). IL-17 retroalimenta o microambiente tumoral pois induz o aumento na expressão de TNF, IL1 β e IL6 devido a sua capacidade de ativar a sinalização NF κ B e MAPK, resultando na promoção do tumor (MEULMEESTER, TEM, 2011). Além disso, a secreção de IL-17 foi correlacionada com razão neutrófilo-linfócito elevada e a expressão do ligante 1 da morte celular programada (PDL-1; também referido como CD274), esses fatores se apresentaram enquanto potencial biomarcadores de mau prognóstico em câncer urogenital (AOTSUKA et al., 2019).

A via do PD1(também referido como CD279) e seu ligante PD-L1 inibe a ativação de células T antitumorais e atua na promoção da autotolerância através da modulação da atividade das células T, ativando a apoptose de células T antígeno-específicas e inibindo a apoptose de células T reguladoras. Todo esse processo retrata um mecanismo do tumor para evasão da resposta imune adaptativa. Por conta disso, o bloqueio da sinalização PD-1/PD-L1 leva à eficácia antitumoral em melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas e carcinoma de células renais. PD-L1 é conhecido por ser altamente expresso em condições inflamatórias, como na presença de IFN- γ , é regulado positivamente

através da sinalização STAT3 induzida por IL-6. Embora, os inibidores da via PD1-PDL-1 tem mostrado sucesso no tratamento de algumas neoplasias, a avaliação/detecção dessas moléculas ainda permanece limitada no CaPe (GARCIA-DIAZ et al., 2017; OHAEBULAM et al., 2015).

Em algumas amostras de CaPe HPV negativo ou HPV positivo, foram detectados importantes moléculas que poderiam explicar as interações do tumor com o Sistema Imune. Robustas técnicas de diferentes análises, entre as quais as que analisam variação no número de cópias alteradas, analisam padrões de hipermetilação ou transcriptoma nas células do tecido tumoral, detectaram, recentemente, o aumento nos genes que codificam proteínas, tais como EGFR, COX2 (MACEDO et al., 2020), MMP1, MMP12, SOX3 (KUASNE et al., 2017), as quais tem implicações na inflamação, na progressão, na migração e na invasão de tumores. Além disso, miRNA 155 já relatado como superexpresso no CaPe foi associado a inibição de células TCD8+ (BI et al., 2000). No entanto, estudos mecanísticos que avaliem como essa resposta efetivamente auxiliam a progressão tumoral no CaPe são limitados.

2.6 Diagnóstico, Estadiamento e Prognóstico do CaPe

O paciente com CaPe exibe como principais sintomas: lesão peniana, dor ou prurido, hemorragias, massas de virilha palpáveis e sintomas urinários. O local mais frequente da neoplasia é a glândula (>50% dos casos), seguido de prepúcio, e pode ainda acometer a haste peniana e o escroto (LETENDRE et al., 2011) (Figura 14).

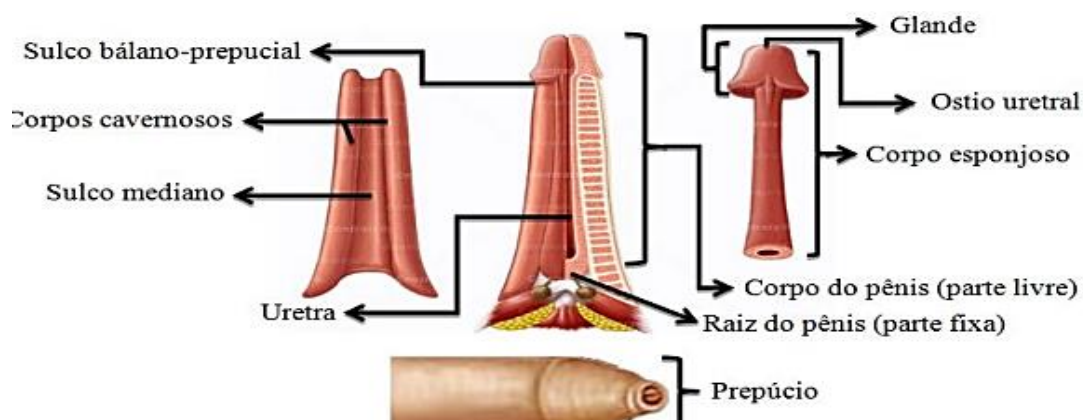


Figura 14. Anatomia da região peniana.

O diagnóstico requer avaliação adequada da lesão primária com biópsia para confirmação do tecido tumoral, estratificação de risco e análise do comprometimento linfonodal. O carcinoma de células escamosas penianas tem um padrão previsível de metástase local e regional, e a metástase linfonodal é o mais forte preditor de sobrevida, com taxas de sobrevida específicas da doença de acordo com o estadiamento, seguindo um padrão inversamente proporcional, isto é, quanto maior o estadiamento, menor a taxa de sobrevida (DJAJADININGRAT et al., 2014).

No exame clínico, a presença da fimose pode dificultar o diagnóstico quando o câncer está escondido sob o prepúcio ou quando surge de dentro da uretra distal. A adenopatia inguinal palpável pode estar frequentemente presente no diagnóstico, mas é geralmente de natureza inflamatória, devido à lesão peniana ulcerada ou infectada. Apenas metade dos pacientes com linfadenopatia palpável possui doença metastática, sendo o restante linfadenopatia inflamatória que se resolve após a ressecção do tumor primário e antibioticoterapia (MOSCONI et al., 2005; SALVIONI et al., 2009). Na adenopatia palpável exame de imagem usando tomografia computadorizada (TC) ou tomografia por emissão de pósitrons (PET)-TC para avaliar a extensão da doença é considerada o padrão ouro (HAKENBERG et al., 2018).

O CaPe e suas lesões precursoras são morfológica e clinicamente heterogêneas e podem ser ainda caracterizadas por análises imuno-histoquímicas (IHQ) e, não comumente usada na prática clínica, as análises genéticas/moleculares. Para avaliação histopatológica nos tecidos de CaPe biopsiados, existem dois sistemas de estadiamento utilizados: o sistema de classificação de Jackson (Figura 15) e o sistema de classificação TNM (Figura 16). Ambos são importantes, e utilizados com frequência na prática clínica, embora o último seja mais completo. A presença e o grau de envolvimento dos linfonodos são os indicadores prognóstico mais importante para o seguimento do tratamento (BRIERLEY, GOSPODAROWICZ, WITTEKIND, 2017).

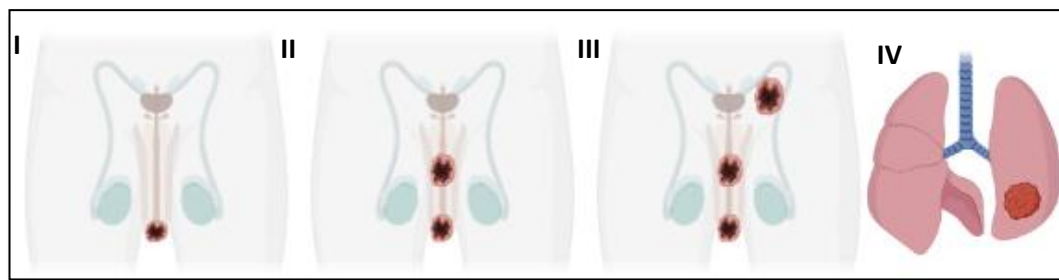


Figura 15. Classificação de Jackson. Estádio I: Tumor limitado à glândula e/ou ao prepúcio; Estádio II: Tumor invade corpo cavernoso; Estádio III: Tumor com metástase (s) para linfonodo (s) inguinal (is); Estádio IV: Tumor invade estrutura adjacente ou presença de linfonodos inoperáveis ou metástase (s) a distância. Autor: 2022 (criado no Biorender.com)

A classificação de tumor, nódulo e metástase (TNM) proposta pela *Union for International Cancer Control–American Joint Committee on Cancer (UICC-AJCC)* é precisa e baseada na avaliação da biópsia ou da excisão cirúrgica, porém nem sempre está disponível nos serviços de saúde (PANER et al., 2018).

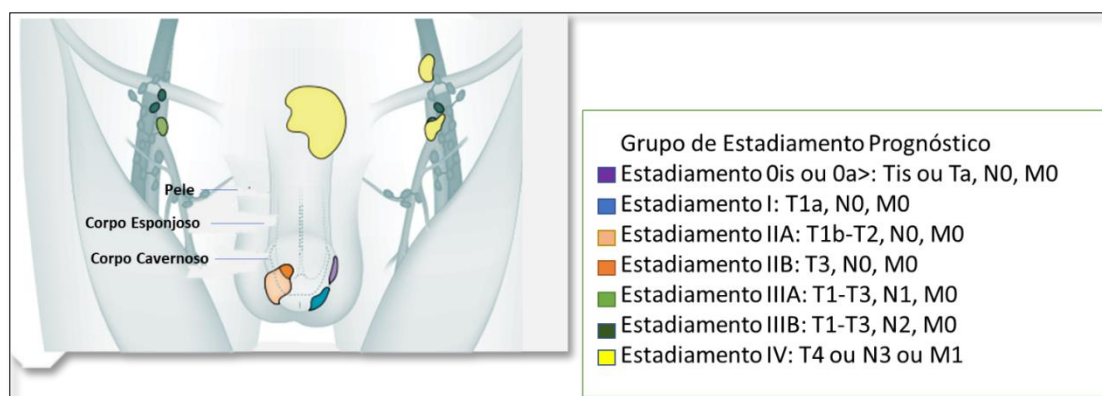


Figura 16. Classificação para estadiamento prognóstico pela ATCC. Adaptado de Thomas et al. (2021).

A mais nova classificação mostra que tumores penianos são subclassificados em HPV associados e HPV independentes, onde os tecidos tumorais HPV+ apresentam resultado positivo na expressão da proteína p16 (Tabela 1).

Tabela 1. Nova classificação de Câncer de pênis e escroto segundo a OMS (MOCH et al;. 2022).

ICD-O-3.2	ICD-O tipo
Benignos e lesões precursoras	
	Condiloma acuminado
	<i>Precursos de carcinoma de células escamosas, HPV associados</i>
8077/2	Lesão intraepitelial de alto grau
	<i>Precursos de carcinoma de células escamosas, HPV associados</i>
8071/2	Neoplasia intraepitelial peniana diferenciada
	Tumor invasivo de pênis e escroto
	Tumor epitelial escamoso invasivo
8085/3	Carcinoma de células escamosas, HPV associado
8083/3	Carcinoma de células escamosas basalóide
8054/3	Carcinoma verrucoso
8084/3	Carcinoma escamoso de células claras
8082/3	Carcinoma linfoepitelial
8086/3	Carcinoma de células escamosas, HPV independente
8086/3	Carcinoma de células escamosas tipo usual
8051/3	Verrucous carcinoma (including carcinoma cuniculatum)
8052/3	Carcinoma papilífero de células escamosas
8074/3	Carcinoma sarcomatóide de células escamosas
8070/3	Carcinoma de células escamosas, Não especificado
	<i>Outros tumores epiteliais</i>
8560/3	Carcinoma adenoescamoso
8430/3	Carcinoma mucoepidermoide
8542/3	Doença de Paget, extramamária
	Outros tumores escrotais
8090/3	Carcinoma de célula basal

OMS= Organização mundial de saúde.

No geral o espectro dos pacientes é bem amplo e, por tanto, desafiador para o diagnóstico. Apenas o exame físico e os exames de imagem não são adequados para avaliar os linfonodos inguinais, e muitos pacientes são submetidos a linfadenectomias não terapêuticas. Sabe-se, no entanto, que nem todos os pacientes com linfonodos

inguinais clínica ou histologicamente negativos evoluem favoravelmente (PANER et al., 2018).

A ultrassonografia pode detectar alterações na arquitetura associadas à metástase, mas tem baixa sensibilidade (74%) e especificidade (77%), quando usada sozinha (CRAWSHAW et al. 2009). Mesmo quando combinada com a punção e com a aspiração com agulha fina (PAAF), a ultrassonografia ainda demonstra resultados variáveis (SAISORN et al. 2006).

Com relação ao tipo histológico, o carcinoma de células escamosas do pênis (CCE- CaPe) representa 95% dos tumores malignos do pênis. Outras neoplasias, como melanomas e sarcomas, são consideradas raras. Várias lesões penianas como leucoplasias, balanite xerótica obliterante, doença de Bowen, papulose Bowenóide e são consideradas como pré-malignas e estão diretamente associadas ao desenvolvimento do carcinoma invasivo de pênis (ORNELA et al., 2004; MICALI et al., 2006).

Em geral, a taxa de sobrevida em 5 anos para câncer de pênis é de 65%. No entanto, as taxas de sobrevivência dependem de vários fatores, incluindo o estágio da doença. A taxa de sobrevivência de 5 anos para pessoas com câncer de pênis que não se invadiu quando é diagnosticado pela primeira vez é de cerca de 80%. Se o câncer invadiu tecidos ou órgãos adjacentes e/ou linfonodos regionais, a taxa de sobrevida em 5 anos é de 50%. Se o câncer se espalhou para uma parte distante do corpo, a taxa de sobrevida em 5 anos é de 9% (ACS, 2021).

Poucos estudos mostram correlações dos dados clínicos em funções imunológicas. No estudo de Davidsson et al. (2019) pacientes que expressavam maiores níveis de PD-L1 tinham câncer de pênis mais agressivo e piores resultados clínicos relacionados a sobrevida. No estudo de Bacco et al., (2020), a expressão positiva de PDL-1 estava relacionada com tumores maiores, estadiamento II e III, maior expressão de p16 (marcador proliferativo) e envolvimento dos linfonodos.

2.6 Tratamento do CaPe

A cirurgia local conhecida como penectomia é o tratamento mais comum em casos de câncer peniano, por controlar a doença e, sempre que possível, preservar a função urinária e sexual. De uma maneira geral, dependendo do tipo e do tamanho da lesão, são realizadas a ressecção do tumor primário e a linfadenectomia inguinal ou ínguino ilíaca

bilateral (LOPES et al. 1996). Como consequência, temos um tratamento localmente mutilante, que gera sequelas físicas e psicológicas, sendo necessários, portanto, um acompanhamento multidisciplinar durante todo o período transoperatório (WANICK et al. 2011).

Ainda quanto a cirurgia é essencial considerar uma margem de segurança entre 1,5-2cm do tumor quando ocorre ressecção cirúrgica afim de evitar recidivas. Naqueles casos em que há infiltração da base do pênis ou tumores mais extensos, as amputações totais com uretostomia perineal são mais apropriadas (LAWINDY et al. 2011). Nos casos de lesões pequenas, em estádios iniciais, o tratamento pode ser realizado por radioterapia, laser terapia e até ressecções regradas, com excisão local da lesão, respeitando, com rigor, as margens de segurança (MOHS et al. 1992; LONT et al. 2006; MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007). Esses tratamentos mostraram inefetivo em grupos de homens obesos, diabéticos, imunossuprimidos e em terapia anticoagulante (YUVARAJA et al. 2017).

Considerando, ainda, que é essencial avaliar linfonodos comprometidos, a linfadenectomia preventiva parece uma ótima alternativa, entretanto, existe ainda um conflito de dados quanto a esse procedimento. Há altos índices de morbidade relacionados à linfadenectomia inguinal preventiva, nos pacientes de risco, levando a índices de complicações, a curto e longo prazo, em 35 a 70% dos pacientes (FICARRA et al. 2006; HAKENBERG et al. 2015). Por outro lado, a não realização da linfadenectomia inguinal pode deixar de tratar 20 a 25% dos pacientes, devido a metástases ocultas, uma vez que as modalidades disponíveis para detecção desses tipos de metástases são insatisfatórias. Sem tratamento adequado, os pacientes evoluem a óbito em dois anos após o diagnóstico, devido a complicações relacionadas ao crescimento local ou metástase (FAVORITO et al. 2008; SHAH et al. 2017).

Assim, é importante considerar chance de cura, efeitos colaterais a curto e longo prazo, possibilidade de retorno da doença após o tratamento, chance de sobrevida longa com ou sem tratamento e efeitos na qualidade de vida. No CaPe é notório que a falta de conhecimento e o estigma social e psicológico significativos associados a doença levam a atrasos na busca pelo atendimento médico, diagnóstico e tratamento. Assim, em pacientes com doença avançada, as opções de tratamento são limitadas e o prognóstico permanece ruim (XAVIER et al., 2014).

Nesse sentido, verifica-se a necessidade do aprofundamento no estudo específico da relação do tumor de cada paciente com o SI, a fim de reverter ou modular condições que ajudem na progressão tumoral fazendo uso da imunoterapia, já que essa terapêutica tem se mostrado com uma alternativa bem-sucedida, duradoura inclusive nos casos em que a doença está mais avançada.

2. 8 Célula dendrítica e imunoterapia

Diante desse cenário que, aparentemente, exhibe o CaPe frente a uma intensa relação com o sistema imune, vale destacar o papel das células dendríticas. As DCs, são células da imunidade inata que tradicionalmente apresentam papel crucial na inflamação e/ou infecção uma vez que conecta os componentes da imunidade inata e da imunidade adaptativa, iniciando, ativando e regulando ambas as respostas. Além do mais, as DCs se destacam entre as APCs porque permitem amplificar respostas frente a peptídeos intra ou extracelulares, por meio de apresentação cruzada e no contexto tumoral são dominantes nesse processo. Por isso, nos últimos anos elas têm sido utilizadas na imunoterapia já que é possível prepará-las *ex vivo* para induzir uma resposta antitumoral direta (BROZ et al., 2014; GARDNER, RUFFEL, 2016).

Dentro da resposta imune as DCs apresentam grande plasticidade nas suas atividades de capturar, processar e apresentar antígenos exógenos às células T, e geralmente são identificadas por sua expressão constitutiva do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II e moléculas coestimulatórias (CD80, CD83, CD86) (LIN et al., 2017). Na ativação efetiva de T naíve é imprescindível a presença de 3 sinais: a interação MHC mais peptídeo antigênico com o TCR constitui o primeiro sinal; o segundo, é a ligação de uma molécula coestimulatória da DC com seu ligante (Ex. CD28) no linfócito; o terceiro, é caracterizado pela produção de citocinas na DC e no Linfócito, IL-12 capaz de induzir a expansão e proliferação de células TCD8⁺ específicas, por exemplo (GARDNER, RUFFEL, 2016), Figura 17.

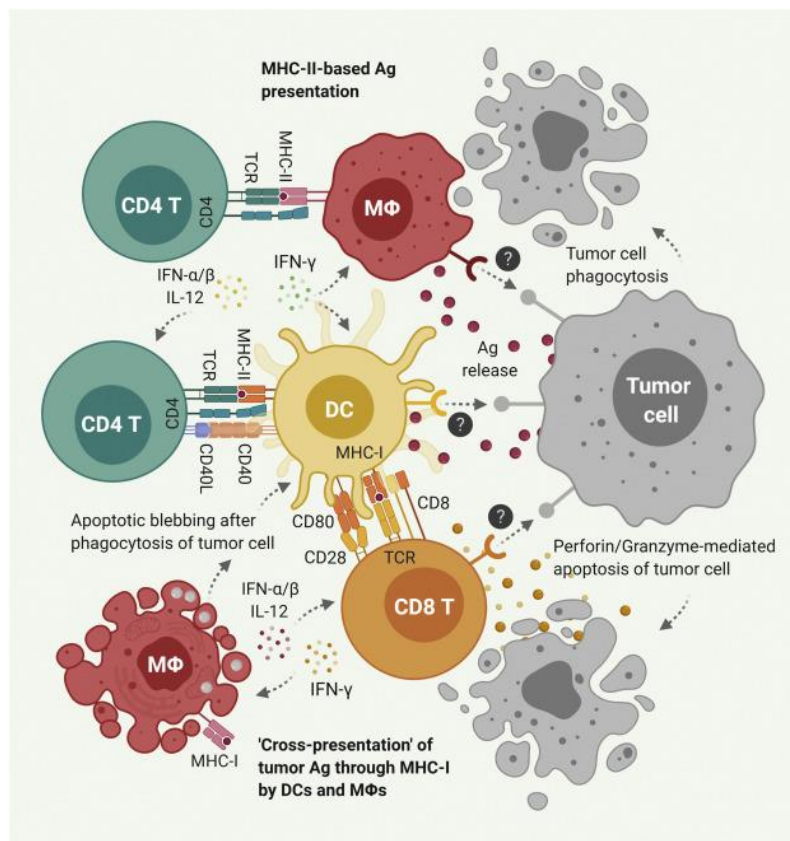


Figura 17. Células dendríticas e ativação de resposta imune (POOREBRAHIM et al. 2020).

Logo no início do processo inflamatório ou reconhecimento de perda da integridade fisiológica, as DCs diferenciadas são imaturas, exigindo sinais de maturação (DAMPs, PAMPs ou citocinas inflamatórias) para exercer inteiramente seu papel na

resposta imune. Após a maturação e ativação, as DCs regulam negativamente a fagocitose, aumentam a expressão de MHC e de moléculas coestimuladoras, aumentam a produção de citocinas e exibem migração aprimorada para os linfonodos. Como resultado das mudanças fenotípicas que ocorrem durante a ativação, as DCs maduras são capazes de iniciar células T *naive* e iniciar a resposta imune adaptativa (GARDNER, RUFFELL, 2016).

Existem dois subconjuntos de DCs ditas convencionais implicadas na resposta antitumoral, as cDC1 e cDC2. cDC1s têm um papel crítico na manutenção da função das células T CD8⁺ dentro dos tumores, provavelmente porque exibe maior capacidade de apresentar antígeno exógeno de forma cruzada e ativar células T CD8. A capacidade de polarizar as células T CD4⁺ são observadas de forma mais proeminente pelo subgrupo cDC2. Ambos os subgrupos são potentes produtores de IL-12, que sustentam essas respostas, todavia, para cDC1 é necessária produção de INF- γ também para manter a resposta TCD8⁺ (COLLIN, BIGLEY, 2018). No microambiente tumoral, IL-10, produzida por macrófagos ou células imunossupressoras, assim como fatores derivados de tumor, como VEGF, inibem a maturação de cDC1s (GARRIS et al., 2018) e prejudicam o desenvolvimento de uma resposta de células T CD8⁺ potente. Contudo, uma resposta imune antitumoral bem-sucedida ainda pode ser estabelecida devido a apresentação cruzada pelas DCs do antígeno tumoral para células T CD8 + *naive* no linfonodo (STEINBRINK et al., 1999).

Porém DCs dentro do microambiente tumoral tem sido frequentemente caracterizada com perfil imunossupressor ou tolerogênico. As vias de sinalização STAT, MAPK e β -catenina foram implicadas na indução de um fenótipo imunossuprimido em DCs infiltrantes de tumor (WANG et al 2014). Evidências mostram dentro do processo inflamatório, os ligantes de TRLs, presentes nas células da imunidade inata, induzam potentes repostas Th1, porém sejam capazes de induzir células T reguladoras secretoras de IL-10 (Treg) através da produção de IL-10 induzida por MAPK p38 por células dendríticas (DC), o que poderia explicar esse perfil. Isso ficou evidente quando a inibição de p38 suprimiu IL-10 e PGE-2 induzidas por TLR e aumentou a produção de IL-12 em DC, ao passo que suprimiu a indução de Treg e aumentou a indução de Th1 (JARNICKI et al., 2008).

As MAPKs são uma família de proteínas quinases de serina/treonina que conduzem as respostas celulares a uma variedade de estímulos, incluindo estresse osmótico, mitógenos, choque térmico e citocinas inflamatórias. Assim essa ativação regula a proliferação celular, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose de células imune. As MAPKs de mamíferos são evolutivamente bem conservadas, tais como as ERK1/2, MAP quinase p38 e quinases c-Jun N-terminais (JNK) reguladas por sinais externos (KIM et al., 2010). No geral, as vias de sinalização apresentam uma MAPK, uma MAPK quinase (MAPKK) e uma MAPK quinase quinase (MAPKKK), e no curso dessa sinalização uma via fosforila e ativam a outra em sequência (DHILLON et al., 2007). Sinais de estresse e estímulos inflamatórios presentes no microambiente tumoral precocemente ativam JNK e p38MKK1, leva à fosforilação e ativação de fatores de transcrição p38v presentes no citoplasma ou núcleo, que caracteriza o princípio da resposta inflamatória.

Nos últimos anos, o conhecimento tem levado a promissoras e efetivas forma de tratamento do câncer através da imunoterapia. No entanto, é importante compreender bem as interações célula a célula e célula- moléculas no micro e macroambiente tumoral, para contornar as falhas decorrentes dessa interação e obter uma resposta efetiva e duradoura.

Vários ensaios clínicos foram desenvolvidos para avaliar o potencial terapêutico de vacinas terapêuticas contra o HPV baseadas em DC. Vacinas de DC específicas mostram induzir T CD4+, produção de anticorpos e uma resposta de células T CD8+ específicas para E7 (WANG et al. 2000). Em outro estudo, apesar da vacina baseada em DC mostrou ser bem tolerada pelos pacientes; no entanto, não aumentou a proliferação de linfócitos em um grau de significância estatística (RAMANATHAN et al. 2014).

Por outro lado, uma valiosa alternativa seria combinar a vacina de DC com a vacina de DNA a fim de montar uma resposta imune potente. Em geral, as estratégias para aumentar a imunogenicidade terapêutica da vacina baseada no DNA do HPV se concentraram em: aumentar a captação do antígeno do HPV pelas DCs; melhorar a expressão, processamento e apresentação do antígeno do HPV em DCs; e aumentar a interação de células DC e T.

Várias estratégias foram empregadas para aumentar o número de DCs de expressão de antígeno/carregadas de antígeno após a vacinação baseada em DNA,

incluindo entrega por arma de genes, microencapsulação, eletroporação, laser e sistemas de entrega baseados em microesferas/nanopartículas (KIM E KIM 2017). Depois que os plasmídeos de DNA que codificam os antígenos HPV são captados pelas DCs, eles devem ser expressos, processados e apresentados.

Melhorar a expressão de antígenos em DCs transfectadas, amplificar a tradução de mRNA de HPV, aumentar a expressão de MHC-I e MHC-II em DCs, melhorar o processamento de antígenos através da via MHC-II e aumentar a apresentação cruzada de antígenos de HPV através da via MHC-I são todos os métodos que foram usados para melhorar a expressão, processamento e apresentação do antígeno do HPV pelas DCs. Além disso, vários métodos para melhorar a função, sobrevivência e interação das células T e DC também foram empregados para melhorar a resposta terapêutica da vacina baseada no DNA do HPV. Esses métodos incluem melhorar a função e a sobrevivência da DC, aumentar as interações das células DC e T, promover a função e a sobrevivência das células T, bem como eliminar as células T reguladoras imunossupressoras no microambiente tumoral (TME) (CHENG et al. 2018).

Entre os genes/moléculas superexpressos pelo CaPe que tem impacto na DC estão as mucinas. Mucinas são glicoproteínas imunogênicas, porém quem não são fortes indutoras de resposta imune, essas moléculas têm sido demonstradas como superexpressas no CaPe (YORITA et al. 2018). O estudo de Hiltbold et al. (2000) mostrou que as mucinas do tipo MUC1 solúvel é prontamente absorvida pelas células dendríticas (DC), mas não é transportada para os endossomos tardios ou compartimentos do MHC classe II para processamento e ligação ao MHC classe II, representando um mecanismo não responsivo a moléculas tumorais, embora aparentemente, não interfira na capacidade da DC de processar e apresentar outros antígenos.

Outra molécula superexpressa no CaPe é o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (MACEDO et al., 2020; MOTA et al., 2021), o qual foi verificado com importante papel no processo inflamatório uma vez que é capaz de regular quimiocinas e recrutar células T, macrófagos, NK e células dendríticas. Além, o uso de uma droga inibidora, o erlitinib em tumores regulou positivamente a expressão de moléculas de MHC de Classe I e II e o cofator da expressão de classe II em queratinócitos (PAUL et al., 2014; POLLACK et al., 2011). Alguns estudos verificaram através de uma técnica de biologia molecular mais robusta, o número de cópias alteradas em genes

associados a inflamação (cicloxigenase- 2- COX-2, e prostaglandina- 2- PGE-2), sugerindo uso de anticorpos Anti-EGFR e Anti-COX-2 como possibilidade terapêutica alvo específica (MACEDO et al., 2020; MOTA et al., 2021).

Uma análise molecular em tecidos de CaPe coletados em hospital publico do Maranhão mostrou tumores que expressaram miR-107 e estavam associados a uma menor sobrevida livre da doença e sobrevida global. Uma análise que avalia o impacto potencial dos miRNAs/genes alvo nas vias biológicas, mostrou que miR-107 tem interação direta na regulação negativa da resposta imune inata, indução de resposta imune a estímulos externos, resposta imune a outros organismos, resposta a estresse e outros processos biológicos (Figura 18) (PINHO et al., 2020). De forma preliminar, esses dados apontam a necessidade de aprofundar o conhecimento em ensaios funcionais dos processos e componentes envolvidos na relação sistema imune e CaPe.

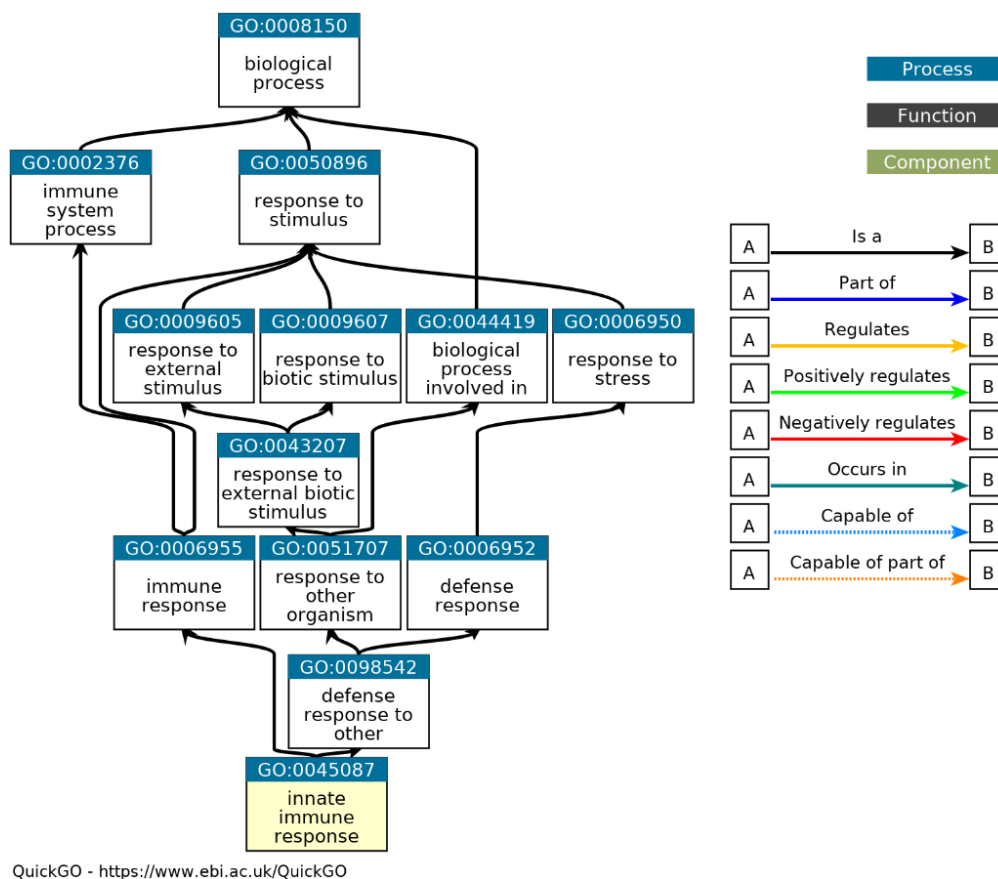


Figura 18. Análise de vias de interação com miRNA 107, usando algoritmo DIANA-miRPath v.3.0. (Autora, 2022)

Dois outros genes relatados como diferencialmente expressos no CaPe foram COX-2 e via PI3K. Acredita-se que a regulação positiva da COX-2 causa uma cascata a jusante da regulação ascendente da PGE2 que, por sua vez, leva a uma infinidade de

eventos, como: angiogênese, divisão celular, ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e ativação adicional da via PI3K; onde a via PI3K mostrou estar alterada em 29% dos tumores (MACEDO et al., 2020), Figura 19. Ainda, os estudos de Udager et al. (2016) e Otenhof et al. (2017) detectaram 40-60% de amostras de CaPe com expressão do ligante de morte programado 1 (PD-L1) principalmente em tumores HPV negativos, essa expressão foi correlacionada com a presença de macrófagos infiltrados.

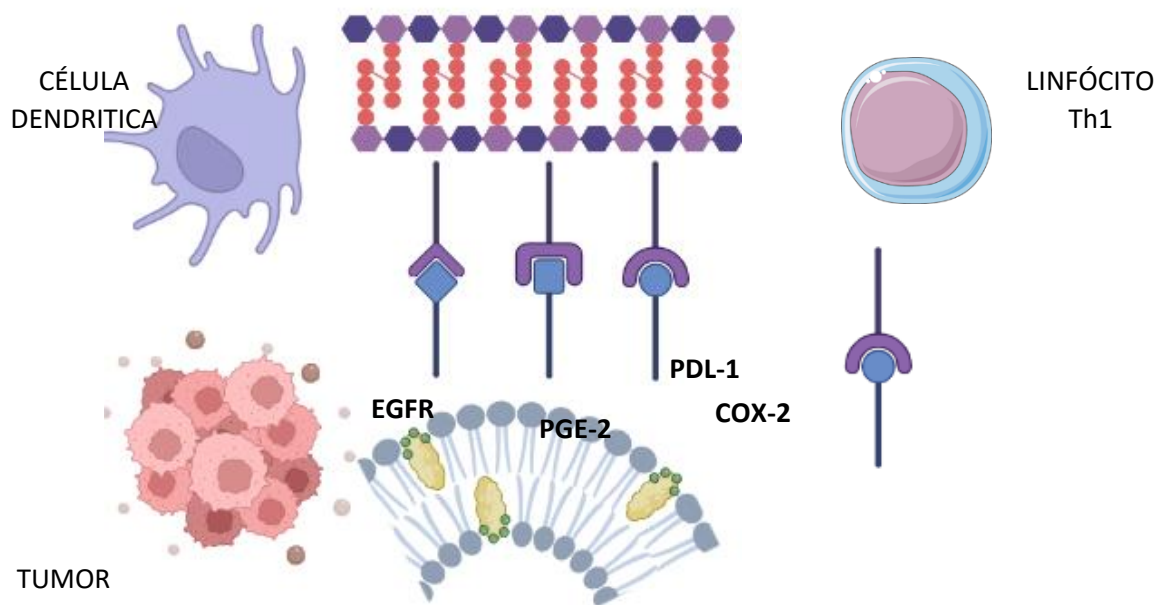


Figura 19. Moléculas codificadas por genes superexpressos no CaPe que alteram a maturação de DCs e resposta imune de células Th1. Fonte: Criado pela autora, 2022 (biorender.com).

Portanto, para CaPe é crucial determinar essas interações imunológicas e possibilitar o conhecimento de quais falhas fisiológicas na resposta imune estão ocorrendo, a fim de avaliar se a modificação desse processo é capaz de reverter a imunossupressão gerada para o escape tumoral e, desse modo, promover um tratamento mais efetivo e duradouro.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o perfil imune celular sistêmico e no microambiente tumoral de pacientes com diagnóstico de carcinoma peniano de células escamosas.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar *in vitro* as diferenças na expressão de marcadores de superfície nas Mo-DCs;

3.2.2 Identificar o percentual de células imune (linfócitos, NK, monócitos, DCs) no lisado tumoral;

3.2.3 Determinar *in vitro* o perfil de citocinas produzidas na co-cultura de Mo-DCs e linfócitos;

3.2.4 Analisar a correlação entre expressão de marcadores de superfície e secreção de citocinas pelas Mo-DCs, sua atividade linfo-estimuladora ou inibitória e o efeito do sobrenadante tumoral;

3.2.5 Correlacionar as alterações morfológicas e imunofenotípicas em linfócitos, NK, monócitos, Mo-DCs, DCs associando com a infecção viral;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto para execução dessa pesquisa foi submetido para aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, obedecendo aos critérios previstos na Resolução do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS) 466/12, itens III.2 “i” e IV.3 “e”. Apresenta aprovação pelo comitê com parecer nº CAAE:1.308.275). Anexo A

4.2 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental com análise do tipo caso-controle realizado com amostras *ex vivo* de sangue periférico e fragmentos de tumor obtidos de pacientes portadores do câncer de pênis e para os doadores saudáveis, coleta de sangue periférico. Os pacientes com CaPe foram aqueles atendidos em um Centro de Referência em Oncologia de São Luís, MA, no período de agosto de 2017 a agosto de 2021.

4.3 Coleta de Dados

4.3.1 Amostra do Estudo e Grupos Experimentais

Foram convidados a participar do estudo homens com diagnóstico de CaPe de células escamosas, ainda não tratados, com idade entre 18 e 90 anos, atendidos em um hospital de referência em oncologia no Estado do Maranhão. Constituindo assim um grupo-caso cuja amostra é dita de conveniência com os pacientes com diagnóstico de CaPe de células escamosas que aceitaram participar da pesquisa.

Para o grupo-controle foram selecionados de forma pareada doadores saudáveis respeitando uma faixa similar de idade com o grupo-caso. As amostras de homens voluntários ditos saudáveis foram aquelas sem histórico de câncer na família, com ou sem infecções prévias, sem hipertensão arterial, sem diabetes e sem obesidade e comporam o grupo “controle”.

4.3.2 Critérios de inclusão

Grupo-Controle

Foram incluídos na pesquisa todos os voluntários que a) compreenderam e assinaram o TCLE; b) participante saudável que voluntariamente aceitaram fazer parte do projeto; c) tivesse idade entre 30 e 85 anos (preferencialmente, idade-pareados com grupo caso); d) com ou sem presença de infecção pelo HPV; e) sem infecções relatadas no momento da coleta;

Grupo-Caso

a) compreenderam e assinaram o TCLE; b) portador do CaPe de células escamosas atendidos no centro de referência para consulta de rotina que ainda não tivessem sido tratados; c) tivessem idade entre 30 e 85 anos; d) tivessem disponibilidade de dados nos prontuários; e) pacientes que não tivesse iniciado tratamento radioterápico e/ou quimioterápico; f) encaminhados à realização de procedimento cirúrgico (penectomia).

4.3.3 Critérios de não inclusão

Foram excluídos da pesquisa todos os pacientes ou voluntários que solicitaram a desistência na participação do estudo.

4.3.4 Coleta de sangue periférico, fragmento tumoral

O sangue periférico foi coletado (dos dois grupos) por punção venosa, com volume final de 20ml em um tubo à vácuo contendo o anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA). Essa amostra seguiu para separação e diferenciação de monócitos. Do grupo caso foi coletado um fragmento do pênis que abrangesse a região tumoral proveniente da penectomia, posteriormente foi utilizado para detecção de DCs e HPV.

4.4 Isolamento de Monócitos e Diferenciação em DCs

As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas da seguinte maneira: em um tubo plástico cônico de 50 ml foi colocado o sangue coletado diluído em reagente foscato salino tamponado (PBS) na proporção de 1:2 e adicionado 12 ml de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Amersham Biosciences, UK). Posteriormente foi submetido à centrifugação a 453g por 40 minutos, a 18°C. Foi realizada a retirada da fase contendo as PBMCs. Após dois ciclos de lavagem (com a mesma centrifugação anterior), as células mononucleares foram quantificadas em

microscópio óptico, na câmara de Neubauer, com análise da viabilidade celular utilizando como corante o Azul de Tripán. Foram utilizadas para ensaios subsequentes aquelas suspensões celulares com viabilidade superior a 90%.

Em seguida, esse conjunto de células (pellet) foi ressuspendido em meio RPMI (Gibco – ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) no volume final desejado. Uma amostra de 1×10^5 das PBMCs foi separada para análise fenotípica (descrito posteriormente) e o restante das células foram utilizadas para cultura de diferenciação. As células foram transferidas para placas de 12 poços e mantidas em estufa de CO₂ “overnight” ou 2 horas a 37°C, para aderência em placas de plástico (NEVES et al., 2005).

Após o período de incubação o sobrenadante foi descartado e as células aderidas à placa foram quantificadas. As células não aderidas foram congeladas para uso em ensaios posteriores.

No intuito de estimular a diferenciação celular, as células aderentes foram cultivadas em meio RPMI contendo 50ng/ml de IL-4 e 50ng/ml de GM-CSF por um período de 7 dias. No quinto dia da cultura, as células dendríticas derivadas de monócitos foram estimuladas para maturação com a adição de 50ng/ml de TNF- α e mantidas em cultura por mais dois dias (NEVES et al., 2005).

4.5 Ensaio de Proliferação de Linfócitos

Para avaliar a capacidade aloestimuladora, 1×10^5 /ml de mo-DCs foram cultivadas com linfócitos T alogênicos (3×10^6 /ml) e fitohemaglutinina, em um volume final de 200ul/poço em placas de cultura de 96 poços. As células foram mantidas por cinco dias em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C, quando a resposta linfocitária foi analisada.

Brevemente, inicialmente os linfócitos T foram incubados em tampão PBS-BSA 0,1% contendo 5uM do marcador *Carboxy Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE). A incubação foi feita a 37°C, no escuro, por 20 min. Após esse período as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em meio RPMI, suplementado com 2% de soro bovino fetal (LYONS, 2000). Em seguida, Os linfócitos foram cultivados com as mo-DCs e avaliados por citometria de fluxo. O mitógeno controle positivo usado na pesquisa foi a fitohemaglutinina (Sigma, Aldrich). Como controle negativo foi avaliado

células que não receberam o estímulo. Os resultados foram analisados pelo *software* FlowJo e comparados a partir do índice de proliferação calculado pelo coeficiente da Intensidade Média de Fluorescência (MFI) do CFSE do linfócito isolado pelo coeficiente do MFI do CFSE de linfócitos mantidos em co-cultura com DCs.

Foi definida uma amostra controle com a presença de linfócitos na ausência de mo-DCs e inicialmente delimitada no *gate* dos linfócitos uma população de menor tamanho e complexidade. Estas células foram separadas em três outros *gates* de acordo com a intensidade do marcador CFSE. O *gate* zero (Gt0) representa as células que não proliferaram, com maior intensidade de CFSE; o *gate* um (Gt1) representa a geração proveniente da Gt0; o *gate* dois (Gt2) representa as células que se dividiram a partir da Gt1, consequentemente com MFI menor que a Gt1.

4.7 Imunofenotipagem das células imune por Citometria de Fluxo

Após a obtenção e contagem das Mo-DCs, alíquotas de aproximadamente 1×10^6 células foram colocadas em tubos plásticos cônicos de 1,5ml e centrifugadas por 5 min, a 290g e 4°C para a obtenção de um “*pellet*” ao qual foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais: CD14 (marcadores de monócitos e macrófagos, ausente em DCs), antígeno leucocitário humano de classe II (HLA-DR), CD11c (Marcador de DCs mielóides), CD40, CD80, CD83, CD86 (moléculas coestimulatórias), CD3 (marcador de linfócitos). Para determinação do fenótipo de membrana, as PBMCs foram selecionadas quanto os princípios da citometria de fluxo definidos por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal relativo ao tamanho (FSC – Forward Scatter) e lateral relativo à granulidade (SSC – Side Scatter).

As células foram mantidas a 4°C, protegidas da luz por 20 minutos. Após a marcação das moléculas de superfície, as placas foram lavadas por duas vezes (5min, 290g, 4°C) com 500 µl de PBS contendo 0,02% de azida sódica e 0,5% de soro albumina bovina. Depois das sucessivas lavagens, seguiremos para a ressuspensão das células em 500 µl de solução de citometria e a aquisição foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, Biosciences, San Jose, USA), num total de 100.000 eventos. Os dados obtidos foram analisados usando-se o *software* FlowJo versão 10.0.

Fragmentos tumorais foram colocados em meio de cultura estéril RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) contendo antibióticos 10,000 I.U./mL Penicilina, e

antimicóticos 10,000 (µg/mL) Estreptomicina. Estes foram cortados em fragmentos de, no máximo, 1mm³, e foram submetidos à digestão por collagenase tipo VIII, 0,056mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As suspensões celulares foram filtradas em gaze e depois foram mantidas em cultura em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. As células obtidas foram marcadas com anticorpos monoclonais e ressuspendidas em tampão para citometria e, também, corridas no citômetro (FACScalibur) e analisados usando-se o “software” FlowJo.

4.8 Detecção de Citocinas

Para detecção de citocinas no plasma do sangue periférico, -no sobrenadante da cultura de células dendríticas e na co-cultura com linfócitos foram utilizados os kits *cytometric beads array* -CBA (BD) para quantificação das citocinas IL-2, INFγ, TNF e IL-4, IL-17, em uma mesma amostra. Seis populações de beads com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). As populações de beads foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menor até a maior intensidade. No CBA, as beads de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio *em sanduíche*. Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 µl de amostra, 50 µl da mistura de beads e 50 µl do reagente de detecção Th1/Th2/Th17 PE (Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent/1 vial, 4ml). O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software FlowJo (BD).

4.9 Ensaio de apoptose em linfócitos

A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit com a molécula Annexina V conjugada com a Fluoresceína - FITC (BD Pharmingen) e iodeto de propídeo-PI. Após, a exposição dos linfócitos ao sobredatante retirado do cultivo das células tumorais foi realizada por 3 dias, plaqueadas em placa de 96 poços fundo U, os linfócitos (Ly) isolados dos pacientes de CaPe e DS foram lavados e incubados em tampão de ligação anexina com anexina V a uma diluição de 1:20 e PI na concentração de 50µg/mL por 15

min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas, resuspendidas em tampão de ligação anexina V, e analisadas por citometria de fluxo imediatamente, de acordo com as instruções do fabricante.

4.10 Análise Estatística

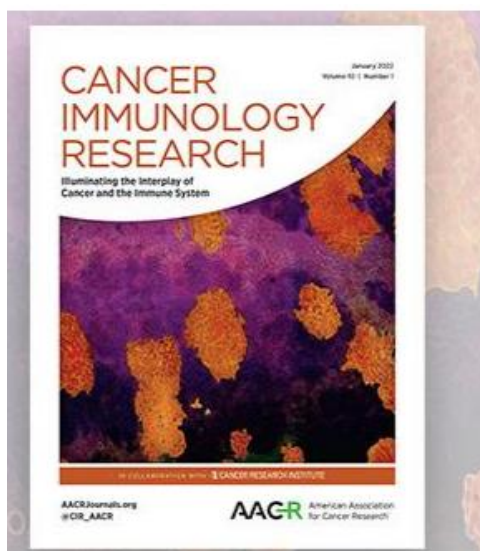
Os demais dados foram tabulados e analisados no Software GraphPad Prism, versão 8.0. As amostras foram submetidas ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. As análises comparativas entre voluntários sadios e pacientes que apresentaram distribuição normal foram avaliadas pelo teste t de *Student*, e Mann Wtheney bem como para análise comparativa de frequências de marcadores. Na comparação entre os grupos foram realizadas análise de variação pelo teste ANOVA. Os resultados foram expressos em médias e $\pm$ desvio padrão (SD) e considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$. Os conjuntos de dados clínicos e imunológicos foram submetidos a correlação de Spearman. Foram representadas diferenças estatisticamente significativas com: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e a discussão da pesquisa estão apresentados na forma de artigo científico.

5.1 Capítulo 01. Artigo 01. Pacientes com câncer de pênis exibem falha nas células dendríticas e modulação inflamatória por linfócitos: aspectos imunológicos de câncer negligenciado

Capítulo I



Revista: Cancer Immunology Research

Fator de impacto:8.070

Qualis:A1

Pacientes com câncer de pênis exibem falha na ativação células dendríticas e modulação inflamatória por linfócitos: aspectos imunológicos de câncer negligenciado

Penile cancer patients exhibited failure in dendritic cells and inflammatory modulation by lymphocytes: immune aspects of neglected cancer

Sulayne Janayna Araujo Guimarães¹, Silma Regina Pereira Ferreira², Ana Paula da Silva Azevedo dos Santos¹

¹ Laboratório de Imunologia aplicada ao câncer, Centro de Biologia e Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luis, Brasil.

² Laboratório de Genética, Centro de Biologia e Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luis, Brasil.

Running title: Immunomodulation profile by penile cancer environment

Título curto: Perfil de imunomodulação do microambiente tumoral

Abstract

Penile cancer is a neglected disease that presents few studies about the host immunity and tumor relationship. The aim described the immunological profile of penile cancer patients (PeCa) and evaluate the monocyte-derived dendritic cells (mo-DC) in the tumor-associated immune response. Peripheral blood, tumor tissue samples, and clinical-histopathological data were collected. The plasmatic cytokines level of patients (n=35) and healthy donors (n=19) were evaluated but did not differ, however, the patient's peripheral blood showed a lower rate of circulating cytotoxic lymphocytes, CD4+/CD8+ ratio (p=0.0143). Patients' monocyte-derived dendritic cells (mo-DCs) showed less co-stimulatory molecules expression, reduce the allo-stimulating capacity of lymphocytes when compared to healthy control, and showed IL-17 production in coculture supernatant. The tumor cells were cultivated *ex vivo* for obtained the supernatant, which induced more apoptoses in healthy than patients-lymphocytes. The tumor cell phenotype showed a high level of tumor-infiltrating CD3+ T cells. Interesting, there was a significant correlation between tumor staging and the cell surface expression of CD86 ($r^2=0.5751$, p=0.0349) and PD-L1 ($r^2=0.7220$, p,00092) in patients' mo-DCs. The results show that patients with penile cancer present tumor-dependent immunosuppressive profiles, opening perspectives for a better understanding of the tumoral microenvironment and immunotherapy.

Key words: Urological cancer; tumor microenvironment; immunosuppression; Tumor-infiltrated lymphocytes; dendritic cells.

Resumo

O câncer de pênis é uma doença negligenciada que apresenta poucos estudos sobre a imunidade do hospedeiro e a relação tumoral. O objetivo foi descrever o perfil imunológico de pacientes com câncer de pênis (PeCa) e avaliar as células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC) na resposta imune associada ao tumor. Sangue periférico, amostras de tecido tumoral e dados clínico-histopatológicos foram coletados. O nível de citocinas plasmáticas dos pacientes (n=35) e doadores saudáveis (n=19) foram avaliados, mas não diferiram, porém, o sangue periférico do paciente apresentou menor taxa de linfócitos citotóxicos circulantes, razão CD4+/CD8+ ($p=0,0143$). As células dendríticas derivadas de monócitos dos pacientes (mo-DCs) apresentaram menor expressão de moléculas coestimuladoras, reduziram a capacidade aloestimulante dos linfócitos quando comparadas ao controle saudável e mostraram produção de IL-17 no sobrenadante de cocultura. As células tumorais foram cultivadas *ex vivo* para obtenção do sobrenadante, o qual induziu mais apoptose em linfócitos saudáveis do que nos linfócitos dos pacientes. O fenótipo de células tumorais mostrou um alto nível de células T CD3+ infiltrantes no tumor. Interessantemente, houve uma correlação significativa entre o estadiamento do tumor e a expressão da superfície celular de CD86 ($r^2=0,5751$, $p=0,0349$) e PD-L1 ($r^2=0,7220$, $p=0,00092$) nas mo-DCs dos pacientes. Os resultados mostram que pacientes com câncer de pênis apresentam perfis imunossupressores tumor-dependentes, abrindo perspectivas para uma melhor compreensão do microambiente tumoral e da imunoterapia.

Palavras-Chave: Câncer urológico; microambiente tumoral; imunossupressão; Linfócitos infiltrados por tumor; células dendríticas.

Financial support: Essa pesquisa foi apoiada pela agência Brasileira Federal Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Ensino Superior – CAPES (Código de Financiamento 001); Fundação de apoio a pesquisa científica e tecnológica do Maranhão (FAPEMA), auxílio financeiro nº 00971/17, 00744/19.

Autor correspondente: Ana Paula Silva de Azevedo-Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966 Bacanga, CEP: 65080-805, São Luís, Brasil, (+55) 98 3272-9526. Email: ana.azevedo@ufma.br

Conflito de interesse: Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas do pênis (CCEP) é uma doença rara em países desenvolvidos, pois ocorre em 0,1-1 por 100.000 homens em países de alta renda, porém, é um tipo comum de câncer em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Thomas,

Necchi et. al. 2021). A região nordeste do Brasil tem a maior incidência de câncer de pênis (6,1/100.000 habitantes) (Coelho, Pinho et al. 2018). Clinicamente, esses pacientes são frequentemente caracterizados por diagnóstico tardio em estágio T2, grau II ou III, com detecção de DNA do HPV e geralmente são submetidos à penectomia (Coelho, Pinho et al. 2018, Macedo, Silva et al. 2020). A terapia é complexa e multifacetada. Por ser uma doença multifatorial, os fatores de risco incluem fimose, inflamação crônica, má higiene peniana, tabagismo, imunossupressão e infecção pelo papilomavírus humano (Thomas, Necchi et al. 2021), além de condições de pobreza e baixo acesso aos serviços de saúde, retardar o diagnóstico (Coelho, Pinho et al. 2018).

Os mecanismos de carcinogênese no CCEP são descritos como HPV-dependentes, através da integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira causando superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7 que causam desregulação do ciclo celular e instabilidade genômica do hospedeiro (Leto, Santos Júnior et al. 2011, Steinestel, Al Ghazal et al. 2015, Spiess, Dhillon et al. 2016, Macedo, Silva et al. 2020, da Silva et al. 2021). Ou não relacionado ao HPV, definido por inflamação crônica e alterações genéticas somáticas por intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio reativo associados a fatores de risco com fimose e líquen escleroso (Greenhough, Smartt et al. 2009, Ornellas e Ornellas 2018, Vieira, Feitoza et al. 2020).

Em ambas as condições, o contexto imune participa da formação do microambiente tumoral. A interação dinâmica de células neoplásicas, imunes, estromais e vasculares determina a sobrevivência de células malignas em tecidos e órgãos (Angell e Galon 2013, Becht, Giraldo et al. 2016). O estudo imuno-histoquímico mostrou que no CCEP primário há mais linfócitos T epiteliais infiltrantes de tumor HPV-positivos do que HPV-negativos (Lohneis, Boral et al. 2015). Chu et al. (2020) relataram semelhanças em imunofenótipos em tecidos de CCEP positivos ou negativos para HPV, mas as amostras positivas para HPV mostraram uma alta densidade de PD-1 intratumoral (Chu, Yao et al. 2020).

Para entender melhor o efeito do microambiente CCEP na imunidade do hospedeiro, foi avaliado o perfil imunológico de células imunes do sangue periférico, citocinas plasmáticas e células imunes infiltrantes no tumor. Além disso, foi determinada a capacidade de maturação de células dendríticas derivadas de monócitos e a viabilidade de linfócitos em cultura de sobrenadante tumoral ex vivo. Os dados podem contribuir para

uma melhor compreensão da relação entre sistema imunológico versus câncer e possíveis estratégias imunoterapêuticas em doenças negligenciadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e coleta de amostras

Amostras de sangue e tecido dos pacientes com CCEP foram coletadas no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), São Luís-Brasil, no período de 2017 a 2020. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Maranhão e pelo Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP-Brasil, CAAE: 46371515.5.0000.5087). Um total de 35 pacientes foram incluídos neste estudo, com média de idade de $60,15 \pm 17,93$ anos, 40% com estadiamento pT2 e pT3, 28,6% apresentando tumor grau II e III, e todos foram submetidos à penectomia total ou parcial (Tabela Suplementar 1,2). O grupo de doadores saudáveis (n=19) foi formado por homens com idade média de $33,9 \pm 11,3$ anos, sem histórico de câncer, não fumantes e sem infecção nos últimos três meses.

Delineamento do estudo

Este foi um experimento de pesquisa com métodos *in vitro* e *ex vivo*. O sangue periférico foi coletado de pacientes e voluntários saudáveis doadores. Para avaliar os componentes imunes sistêmicos, as citocinas plasmáticas foram medidas por cytometric bead Array (CBA) e as células foram utilizadas para ensaio de fenótipagem por citometria de fluxo e cultura de diferenciação *in vitro*. Células dendríticas foram geradas a partir de monócitos sanguíneos (mo-DCs) e a expressão de moléculas de ativação entre pacientes e doadores saudáveis foi comparada. O tecido tumoral dos pacientes foi fragmentado e utilizado para fenótipo de células imune infiltradas e cultura *ex vivo*. O sobrenadante do tumor foi usado como microambiente tumor relacionado nos ensaios funcionais mo-DC e linfócitos. Além disso, foram realizadas as correlações dos dados clínicos, histopatológicos e imunológicos.

Coleta de sangue e protocolo de geração de mo-DCs

Buffy coat de amostras de sangue periférico (5-10mL) de pacientes e doadores de sangue saudáveis foram usados para isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs). O plasma foi armazenado até o uso no ensaio de citocinas. DCs maduras de ambos os grupos foram produzidas por procedimentos padrão (Neves, Ensina et al. 2005).

Resumidamente, PBMCs foram isolados de buffy coats de sangue periférico através do gradiente de densidade com reagente Ficoll. As células aderentes (monócitos) foram semeadas em placas de 12 poços e cultivadas em meio de cultura celular (RPMI 1640, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de antibiótico e GM-CSF humano recombinante 50 ng/mL⁻¹ (PeproTech) e 50 ng/mL⁻¹ de IL-4 (PeproTech) para gerar DCs imaturas. No quinto dia de cultura, 20 ng/mL⁻¹ de TNF- α (PeproTech) foi adicionado à cultura para gerar mo-DCs maduras. Após 7 dias de cultura, as células não aderentes ou frouxamente aderentes foram colhidas, lavadas uma vez com PBS e usadas para os experimentos.

Deteção de citocinas no plasma e no sobrenadante da co-cultura de linfócitos e mo-DCs

Os plasmas e os sobrenadantes da co-cultura foram armazenados a -80°C até a determinação dos níveis de citocinas. Os sobrenadantes foram coletados das mo-DCs de doadores saudáveis e de pacientes no sétimo dia. Os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-2, IL-17 e TNF- α de ambos os grupos de amostras foram determinados usando um kit Cytometric Bead Array System humano (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante analisadas no citometro de fluxo FACS Calibur (BDBiosciences).

Fenótipo das células imune

Alíquotas de 1x10⁵ células foram incubadas por 30 min, com PBS e anticorpo: CD14 (BD Biosciences Cat# 555397, RRID:AB_395798), CD86 (BioLegend Cat# 305422, RRID:AB_2074981), HLA-DR (BD Biosciences Cat# 339194, RRID:AB_647443), PDL-1 (BD Biosciences Cat# 563741, RRID:AB_2738399), NFkB (BD Biosciences Cat# 558423, RRID:AB_647222), CD3 (BioLegend Cat# 300312, RRID:AB_314048), CD8 (BioLegend Cat# 300906, RRID:AB_314110), CD4 (BD Biosciences Cat# 555347, RRID:AB_395752), CD19 (BioLegend Cat# 302210, RRID:AB_314240), CD56 (BD Biosciences Cat# 555516, RRID:AB_395906) e PD-1 (BioLegend Cat# 367410, RRID:AB_2566680) (Tabela Suplementar 3). Após esse período, as células foram lavadas com PBS e analisadas em citômetro de fluxo InCyte Guava (Luminex Corporation). Os dados foram analisados usando o software FlowJo (v.10).

Índice de proliferação de linfócitos alogênicos

Os linfócitos alogênicos obtidos de doadores saudáveis foram marcados em PBS com 2,5 μ M de carboxil fluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Sigma-Aldrich) e co-cultivados com mo-DCs de pacientes ou doadores saudáveis por 3 dias. Os sinais fluorescentes foram analisados por citômetro de fluxo, de acordo com as instruções do fabricante. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido em um citômetro de fluxo FACSCalibur e analisado usando o programa de análise de dados de citometria (FlowJo Software, v.10; RRID: SCR_008520).

Análise de células imune infiltradas no tumor

O tumor fresco foi coletado e cortado em pequenos fragmentos em uma placa de Petri. Os fragmentos obtidos foram colocados em tubos estéreis com 5mL de meio RPMI 1640 por grama de tecido e foi adicionada collagenase tipo IV (Sigma) (0,056 mg/mL) na proporção de 500 μ L de enzima para cada 9,5 mL de meio. As suspensões foram levadas a banho-maria a 37°C por 2 horas (Miescher, Whiteside et al. 1986). A suspensão de células obtida a partir da digestão enzimática foi corada com corante Trypan Blue (0,04%) e contada em uma câmara de Neubauer da qual 2×10^5 células tumorais foram centrifugadas e o sedimento ressuspensionado para análise fenotípica por citômetro de fluxo conforme descrito acima. E 1×10^4 células tumorais foram mantidas em cultura em placas de 12 poços por 5 dias. Após o sobrenadante ser removido, centrifugado e utilizado (10%) como estímulo linfocitário em ensaio de apoptose por 3 dias em placa de 96 poços com 100 μ L de meio suplementado.

Análise de apoptose em linfócitos

Para a realização do ensaio de apoptose, os linfócitos foram incubados por três dias com sobrenadante cultivado de células tumorais e avaliado por citometria de fluxo utilizando anexina V (BD Pharmingen). Após a conclusão da coloração da superfície, os linfócitos (Ly) isolados de pacientes e doadores saudáveis foram lavados e incubados em tampão de ligação de anexina V com anexina V em uma diluição de 1:20 por 15 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas, ressuspensas em tampão de ligação de anexina V e analisadas por citometria de fluxo imediatamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo GraphPad Prism (v10). Médias e desvio padrão (DP) foram representados. Para comparar a diferença entre os grupos de pacientes e doadores saudáveis utilizou-se o teste não paramétrico Main-Whitney U, e para três ou mais grupos foi utilizada a análise de variância de Kruskal-Wallis, seguida do teste posthoc de comparação múltipla de Dunn. O teste *t* foi usado para avaliar os dados de proliferação. As correlações de classificação de Spearman foram analisadas entre o conjunto de dados clínicos, histológicos e imunológicos. As diferenças estatisticamente significativas foram representadas como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

RESULTADOS

Os níveis de citocinas no sangue dos pacientes com CCEP não foram diferentes dos doadores saudáveis, mas tinham proporcionalmente menos linfócitos T citotóxicos

A concentração de citocinas séricas nos pacientes não apresentou diferenças com o grupo de doadores saudáveis. Embora os níveis de citocinas de IL-6 (11,2pg/mL $\pm$ 30,1 pg/mL) e IL-4 (5,5pg/mL $\pm$ 7,9 pg/mL) tenham sido 3 e 4 vezes maiores, respectivamente, em comparação com controles saudáveis (IL -6: 1,6 pg/mL $\pm$ 2,0 pg/mL e IL-4: 1,2 pg/mL $\pm$ 1,6 pg/mL) (Figura 1 suplementar). O fenótipo PBMC mostrou que a população de linfócitos T não apresentou diferenças na frequência de células T citotóxicas (CD3+CD8+) ou auxiliares (CD3+CD4+) entre pacientes e doadores saudáveis (Figura 1A-C). Apesar disso, vale ressaltar que a razão CD4+/CD8+ nos pacientes (2,6 $\pm$ 0,6) foi maior do que nos doadores saudáveis (1,2 $\pm$ 0,6; $p=0,0143$) (Figura 1D). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as células CD3+CD4+PD1+ e CD3+CD8+PD1+ (Figura 1E-H).

A falha de maturação nas células dendríticas derivadas de monócitos dos pacientes mostrou um perfil de citocinas Th17 e menor atividade de proliferação de linfócitos

Após os estímulos de diferenciação e maturação in vitro, a frequência de mo-DCs foi a mesma entre pacientes e doadores saudáveis (Figura 2A). Na análise da expressão de moléculas coestimuladoras em mo-DCs, os dados mostraram que a frequência de células CD86+ não diferiu entre pacientes e doadores saudáveis (Figura 2B). No entanto, a expressão de CD86+ em pacientes com mo-DCs foi menor do que em doadores saudáveis

com mo-DCs (Figura 2C). As mo-DCs maduras que expressam PD-L1 não mostraram a diferença entre pacientes e doadores saudáveis na molécula de checkpoint (Figura 2D e E). Assim como a ativação da expressão de transcrição B do fator nuclear (CD86+ PD-L1+ NF- κ B+) foi a mesma em pacientes e doadores saudáveis ativados mo-DCs (Figura 2F e 2G). Além das alterações fenotípicas, na cultura do sobrenadante das mo-DCs dos pacientes foi detectada IL-17, embora não tenha sido detectada em doadores saudáveis (Figura 2H). As citocinas como TNF- α , IL4, IL6 e IL10 foram detectadas, mas não mostraram diferença entre os grupos. Além disso, as mo-DCs do paciente apresentaram menor capacidade de proliferação de linfócitos quando comparadas às mo-DCs de doadores saudáveis (Figura 2I).

Células imunes infiltradas no tecido canceroso peniano mostraram a maioria dos linfócitos T e macrófagos

Para investigar ainda mais os estados imunes intratumorais, a infiltração de células imunes populacionais foi analisada por citometria de fluxo. Linfócitos T ($7,9\% \pm 12,93\%$) e macrófagos ($5,27 \pm 4,17$) representaram as principais células imunes infiltradas no tumor, mas a frequência foi variável entre as amostras individuais. Os linfócitos B ($1,84 \pm 4,5$) e Natural Killer ($0,26 \pm 0,83$) apresentaram menor frequência (Figura 3A).

Na análise da molécula de checkpoint PD-L1 em células tumorais, em células de maior tamanho e complexidade, as células apresentaram uma média maior na população CD14-CD86-PD-L1+ ($41,79 \pm 19,62$ em comparação com CD14-CD86+PD-L1+ ($10,07 \pm 14,81$) (Figura 3B).

Linfócitos de doadores saudáveis foram induzidos à apoptose quando cultivados com tumor sobrenadante

Para simular o efeito do microambiente tumoral na viabilidade dos linfócitos, utilizou-se com estímulo o sobrenadante da cultura de células tumorais ex vivo (Figura 4A). A viabilidade dos linfócitos não diferiu entre os grupos quando mantidos no meio de cultura (Figura 4B). No entanto, os linfócitos de doadores saudáveis mostraram menos viabilidade do que os linfócitos de pacientes quando cultura com sobrenadante tumoral (Figura 4F). As moléculas solúveis produzidas pelas células tumorais induziram apoptose em linfócitos saudáveis (Figura 4C). Mesmo com maior presença de necrose nos

linfócitos dos pacientes, a viabilidade dessas células parece ter sido favorecida com o sobrenadante tumoral (Figura 4I).

As células imunes infiltrantes de tumor e o estado clínico do câncer apresentaram correlações

Uma análise adicional foi realizada para verificar a correlação dos dados clínicos e de células imunes infiltrantes de tumor. Os dados não mostraram correlações estatisticamente significativas entre células CD3+ ou CD19+ e idade, grau do tumor, tamanho do tumor, estadiamento, status de HPV nos dados histológicos de PSSC. No entanto, foi descrita uma correlação inversa entre células CD56+ e grau tumoral ($r=-0,8932$, $p=0,001$) e tamanho tumoral e CD14+ ($r=-0,6344$, $p=0,006$). Considerando que a expressão de CD86 é um marcador de DC, as análises de correlação mostraram uma associação positiva entre DCs infiltradas ($r=0,5751$, $p=0,0349$) e estadiamento tumoral, sendo esta associação mais forte quando comparada com CD86+PD-L1+ células ($r=0,7220$, $p=0,0092$) (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Embora os mecanismos de subversão da resposta imune sejam bem descritos em vários tipos de câncer, o conhecimento sobre as respostas imunes no câncer de pênis é limitado. Para descrever um perfil imunológico, os níveis de citocinas e fenotipagem de linfócitos foram avaliados e os dados não mostraram diferenças estatísticas entre pacientes e voluntários. No entanto, a alta presença de citocinas associadas a Th2 (IL4 e IL6) e menor proporção de linfócitos T citotóxicos do que linfócitos T auxiliares nas amostras dos pacientes, sugere que o tumor foi capaz de modular a imunidade do hospedeiro. O viés Th2 em tumores com padrão inflamatório foi descrito como uma forma de subversão do sistema imunológico (Marigo, Dolcetti et al. 2008). Os níveis de IL4 aumentados e os linfócitos com padrão Th2 foram associados a câncer colorretal de mau prognóstico (Pellegrini, Berghella et al. 1996) e câncer do colo do útero (Lin, Niu et al. 2019). A IL6 é uma citocina inflamatória associada ao câncer que induz o crescimento e a sobrevivência das células tumorais, induz a angiogênese (Taher, Davies et al. 2018, Uciechowski e Dempke 2020) e promove a imunossupressão ao inibir as células NK (Konjevic, Vuletic et al. 2012; Mineto et al., 2019), induzir células MDSC (Weber, Groth et al. 2021) e reduzir a resposta das células T citotóxicas (Lee, Jang et al. 2019). Curiosamente, os pacientes incluídos no estudo tinham diagnóstico de carcinoma in situ,

por outro lado, os dados apresentados foram analisados em sangue periférico, sugerindo que, mesmo sendo sutil, o "microambiente" tumoral foi capaz de induzir uma subversão imunológica sistêmica.

Através de um ensaio *in vitro*, foi determinado se as mo-DCs dos pacientes tinham capacidade de ativação semelhante, com o mesmo estímulo, quando comparadas com as mo-DCs de voluntários saudáveis. Os resultados mostraram que os monócitos dos pacientes são capazes de serem diferenciados em DCs. No entanto, após o estímulo de maturação, as mo-DCs dos pacientes apresentaram menor expressão de moléculas coestimuladoras, sugerindo uma subversão imune induzindo DCs imaturas. As DCs desempenham um papel importante na iniciação, desenvolvimento e regulação da resposta imune antitumoral durante a apresentação do antígeno tumoral (Steinman e Banchereau 2007, Dhodapkar, Dhodapkar et al. 2008, Steinman 2012). Por outro lado, o microambiente tumoral desfavorece a ativação das DCs, incluindo evidências de que as DCs carregam um fenótipo "imaturo" no tecido canceroso e linfonodo drenante, induzindo resposta tolerogênica a favor do tumor (Dhodapkar, Dhodapkar et al. 2008, Palucka e Banchereau 2012). No estado imaturo, as DCs expressam menos moléculas coestimuladoras, como CD86, que reduzem a eficiência na sinapse imune entre DCs e células T e inibem a imunidade tumoral efetiva (Kim, Emi et al. 2006, Bijker et al., 2008, Kim e Kim 2019).

Esse fenótipo imaturo apresentado pelas mo-DCs dos pacientes corrobora com os resultados funcionais, uma vez que a capacidade de induzir a proliferação de alolinfócitos foi reduzida quando comparada com as mo-DCs de doadores saudáveis. Células dendríticas derivadas de monócitos imaturos obtidas da criopreservação de monócitos humanos apresentaram menor expressão de moléculas coestimuladoras e proliferação de linfócitos induzida prejudicada (Silveira, Wowk et al. 2013). Além disso, na cultura de mo-DCs dos pacientes foi detectada a citocina IL17 que não foi detectada na cultura de sobrenadante de mo-DCs dos doadores saudáveis. DCs imaturas promovem células T CD4⁺ produtoras de IL17 que corroboram com a progressão do câncer (Dhodapkar, Barbuto et al. 2008, Ortiz, Kumar et al. 2015, Barilla, Diskin et al. 2019). Os dados reforçam que no câncer de pênis, o "microambiente" tumoral induziu falha na maturação das DCs, redirecionando a resposta adaptativa para Th2/Th17 do que para Th1. O método de cultura de diferenciação de mo-DC usado neste trabalho não excluiu todos os linfócitos

da amostra, sugerindo que as PBMCs dos pacientes parecem estar direcionadas para uma menor resposta imunogênica.

A contexto imune integra o “microambiente” tumoral com impacto clínico na evolução do paciente (Angell e Galon 2013, Becht, Giraldo et al. 2016). Células imunes infiltrantes de tumor em pacientes com CEP mostraram uma frequência maior que 10% de linfócitos T e macrófagos. O “microambiente” tumoral que apresenta níveis de produção de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de células T é caracterizado como “quente” (Duan, Zhang et al. 2020). A fimose causa um acúmulo de líquen escleroso que induz uma condição inflamatória crônica, descrita como fator de risco para CEP (Clouston, Hall et al. 2011). Além disso, a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) pode contribuir para a carga mutacional do tumor e interação com a resposta imune mediada pelo vírus e, consequentemente, o contexto imune no CCEP (Macedo, Silva et al. 2020).

Apesar de descrever o perfil das células imunes sem caracterizar suas subpopulações efectoras ou tolerogênicas, os dados sugerem que o CEP apresenta um imunograma "quente", capaz de induzir um padrão Th2/Th17, mantendo o "microambiente" inflamatório a favor do tumor, mas subvertendo a resposta imune à resposta de ineficiência. Neste trabalho, amostras de CCEP HPV-positivas apresentam uma frequência próxima a 48%. No entanto, 17% das amostras não tiveram detecção de HPV relatada. Outros estudos realizados na mesma população mostraram uma frequência de tumores HPV-positivos acima de 90%. Assim, os dados sobre a infecção pelo HPV podem ser subestimados neste estudo.

Em geral, os tumores “quentes” apresentam maiores taxas de resposta à imunoterapia, como terapia anti-ligante de morte programada (PD-L1/PD-1) (Blank, Haanen et al. 2016, Zemek, Chin et al. 2020). Além disso, no CCEP avançado, a alta expressão de PD-L1 foi relacionada (Cocks, Taheri et al. 2017), sugerindo que a imunoterapia de checkpoint é uma terapia eficiente. Células imunoinfiltrantes que expressam PD-L1 foram detectadas e os resultados mostraram uma correlação positiva de células CD86+PD-L1+ com pior estadiamento do tumor. Considerando que as DCs expressam CD86, os dados podem reforçar a ideia de que o TME é capaz de inibir a ativação de DCs que, este ao expressar PD-L1, favorece a inativação de linfócitos efetores.

Em resumo, o presente trabalho mostra diferenças sutis nas populações de linfócitos e citocinas plasmáticas entre pacientes e doadores saudáveis, favorecendo uma resposta Th2. Dados in vitro mostraram que as células dos pacientes são menos eficientes na geração de DCs maduras, reduzindo a eficiência de ativação de linfócitos, também observado o efeito imunossupressor com o microambiente tumoral. Além disso, os resultados mostram células imunoinfiltrantes na expressão de CCEP e PD-L1. Assim, os achados sugerem que o CCEP é um tumor inflamatório capaz de subverter a resposta imune ao padrão Th2/Th17, reduzindo a resposta imune efetora contra o tumor.

Conflito de interesse

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesse.

Contribuições dos autores

SJAG: Curadoria de dados; Análise formal; Investigação; Metodologia; Administração de projetos; Redação - revisão e edição. MCBR: Curadoria de dados; Investigação; Redação – revisão. ALAB: Investigação; Redação – revisão. JMS: Investigação; Redação – revisão. AJSD: Investigação; Redação – revisão. LN: Investigação; Redação – revisão. RWPC: Investigação; Redação – revisão. AAMV: Investigação; Redação – revisão. SRFP: Recursos; Redação – revisão. APSAS: Recursos; Conceituação; Investigação; Metodologia; Administração de projetos; Visualização; Validação; Redação - revisão e edição.

Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pela Agência Federal de Apoio e Avaliação da Pós-Graduação – CAPES (Código de Financiamento 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA) e Universidade Federal do Maranhão.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Hospital Aldenora Bello pela assistência clínica e principalmente aos seus pacientes e voluntários, sem os quais este estudo não teria sido possível.

FIGURAS E LEGENDAS

Table Suplementar 01. Parâmetros clínicos e histológicos de pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) do pênis.

Características clínicas	Total n=35	(%)
Idade média	60,20±17,93(ano)	---
HPV status		
HPV+	17	48,57
HPV-	12	34,28
Sem informação	6	17,14
Presença de fimose		
Sim	15	42,85
Não	6	17,14
Sem informação	14	40
Subtipo histológico		
Usual	7	20
Condilomatoso	10	28,57
Misto	6	17,14
Basaloide	2	5,71
Verrucoso	1	2,85
Sem informação	9	25,71
Tamanho do tumor (cm)		
0,7-5,4	24	68,57
5,4-10,1	2	5,71
14,8-19,5	1	2,85
Sem informação	8	22,85

Local do tumor		
Glande	13	37,14
Prepúcio	2	5,71
Corpo	2	5,71
Múltiplas áreas	8	22,85
Sem informação	10	28,57
Grau do tumor		
I	6	17,14
II	5	14,28
III	5	14,28
Sem informação	19	54,28
Estadiamento do tumor		
pT1	4	11,42
pT2	7	20
pT3	7	20
pTis	1	2,85
Sem informação	16	42,85
pTis = extensão do tumor primário in situ.		

Tabela Suplementar 02. Características sociodemográficas da amostra de estudo, São Luís, Maranhão, Brasil.

Variáveis sociodemográficas	Total N=35	(%)
Ocupação		
Lavrador	25	71,4
Desempregado	3	8,6
Agricultor	1	2,8
Pescador	1	2,8
Freelance	1	2,8
Proprietário de hardware	1	2,8
Não informado	3	8,6
Região de residência		
Regiões metropolitanas	4	11,4
Outros municípios do Estado	25	71,4
Não informado	6	17,1
Estado civil		
Solteiro	6	17,1
Casado	18	51,4
Viúvo	4	11,4
Divorciado	3	8,6
Não informado	4	11,4
Nível de escolaridade		
Nenhum	16	45,7
Primário	16	45,7
Secundário ou Universitário	0	0
Não informado	3	8,6
Étnica relacionada		
Preto	7	20
Pardo	9	25,7
Amarelo	3	8,6
Branco	3	8,6

Não informado	13	37,1
Tabagismo		
Confirma	15	42,9
Nega	13	37,1
Não informado	7	20
Etilismo		
Confirma	18	51,4
Nega	10	28,6
Não informado	7	20

Tabela 03. Conjunto de marcadores utilizados no ensaio de imunofenotipagem

Painel	Marcador	Catálogo	Clone	Fluoróforo	Empresa
Para caracterização de mo-DC	CD14	555397	--	FITC	BD
	HLA-DR	339194	--	PerCP Cy 5.5	BD
	CD86	305422	IT2.2	PE Cy7	Biolegend
	PD-L1	563741	MIH1	APC	BD
	NFκB	555516	--	PE	BD
Para caracterização de Linfócitos	CD3	300312	HIT3A	APC	Biolegend
	CD4				
	CD8	300906	HIT8A	FITC	Biolegend
	PD-1	367410	NAT105	PerCP Cy 5.5	Biolegend
Para caracterização de DC e não DC no tecido tumoral	CD14	555397	--	FITC	BD
	HLA-DR	339194	--	PerCP Cy 5.5	BD
	CD86	305422	IT2.2	PE Cy7	Biolegend
	PD-L1	563741	MIH1	APC	Biolegend
	NFκB	558423	K10895.12.50	PE	Biolegend
Para caracterização das células infiltrantes no tecido tumoral	CD3	300312	HIT3A	APC	Biolegend
	CD14	555397	--	FITC	BD
	CD19	302210	HIB19	PE Cy5	Biolegend
	CD56	555516	--	PE	BD

CD= Cluster differentiation; FITC= fluorescein isothiocyanate; PE= R-phycoerythrin; APC= Allophycocyanin.

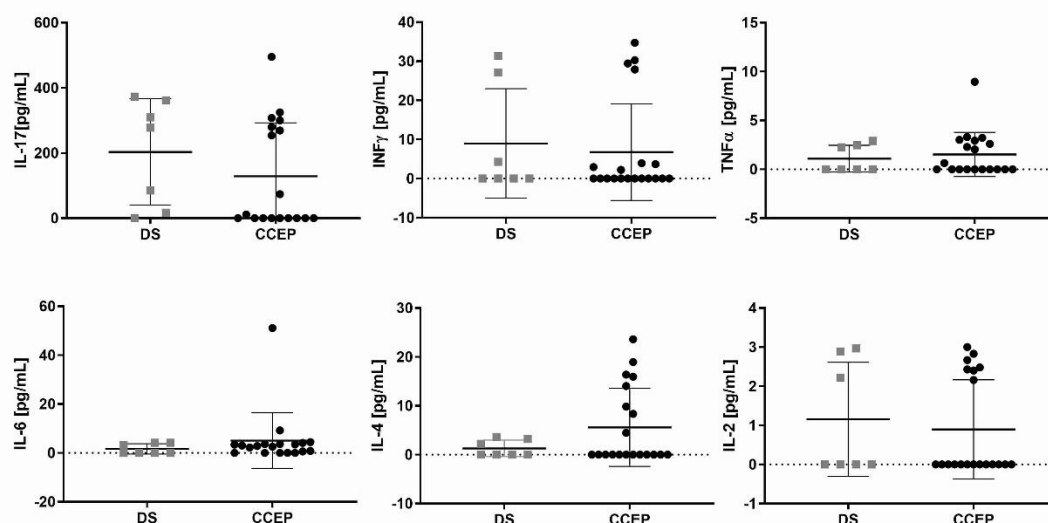


Figura Suplementar 01. **Os níveis de citocinas obtidos no sangue de pacientes com câncer de pênis não são diferentes dos níveis nos doadores saudáveis.** O plasma foi adicionado a um sistema multiplex para analisar uma variedade de citocinas. Gráfico representando as concentrações médias $\pm$ SD de IL-17, IFN- γ , TNF α , IL-6, IL-4 e IL-2 medidas com ensaio de arranjo de esferas citométricas (CBA) e analisadas por citometria de fluxo. Cada ponto no gráfico representa um indivíduo, representado por pacientes-CCEP (n=18) e doadores saudáveis-DS (n=7). Todos os indivíduos foram analisados em experimentos independentes. Pacientes e doadores saudáveis foram comparados usando o teste U de Mann Whitney não pareado e não paramétrico.

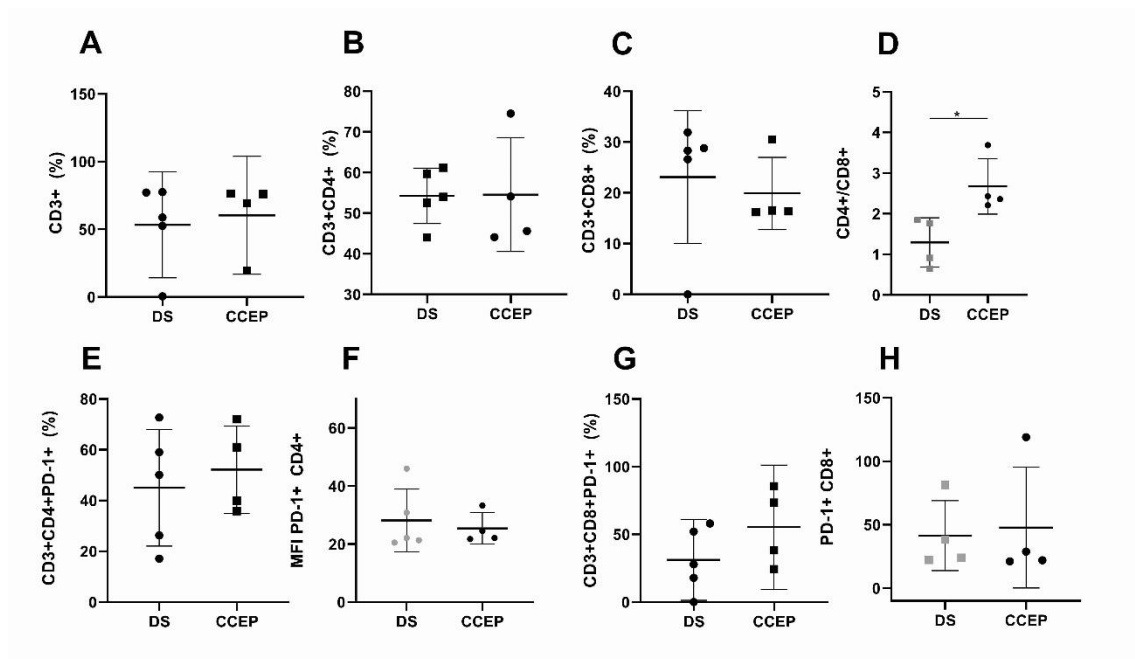


Figura 01. **Maior nível de CD4+ sugetso de perfil Th2 predominante.** (A) Frequência de células CD3+, (B) frequência de células CD3+CD4+ (C) Frequência de células CD3+CD8+.(D) Razão CD3+CD4+ versus CD3+CD8+ analisada (E, G) Frequência de células CD3+ CD4+PD-1+ e CD3+ CD8+PD-1+, respectivamente. (F, H) intensidade de fluorescência mediana em linfócitos CD3+ CD4+PD-1+ e CD3+ CD8+PD-1+, respectivamente, analisados em pacientes (n=4) e doadores saudáveis (n=4) (* $p \leq 0,005$). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP e utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para comparação dos grupos.

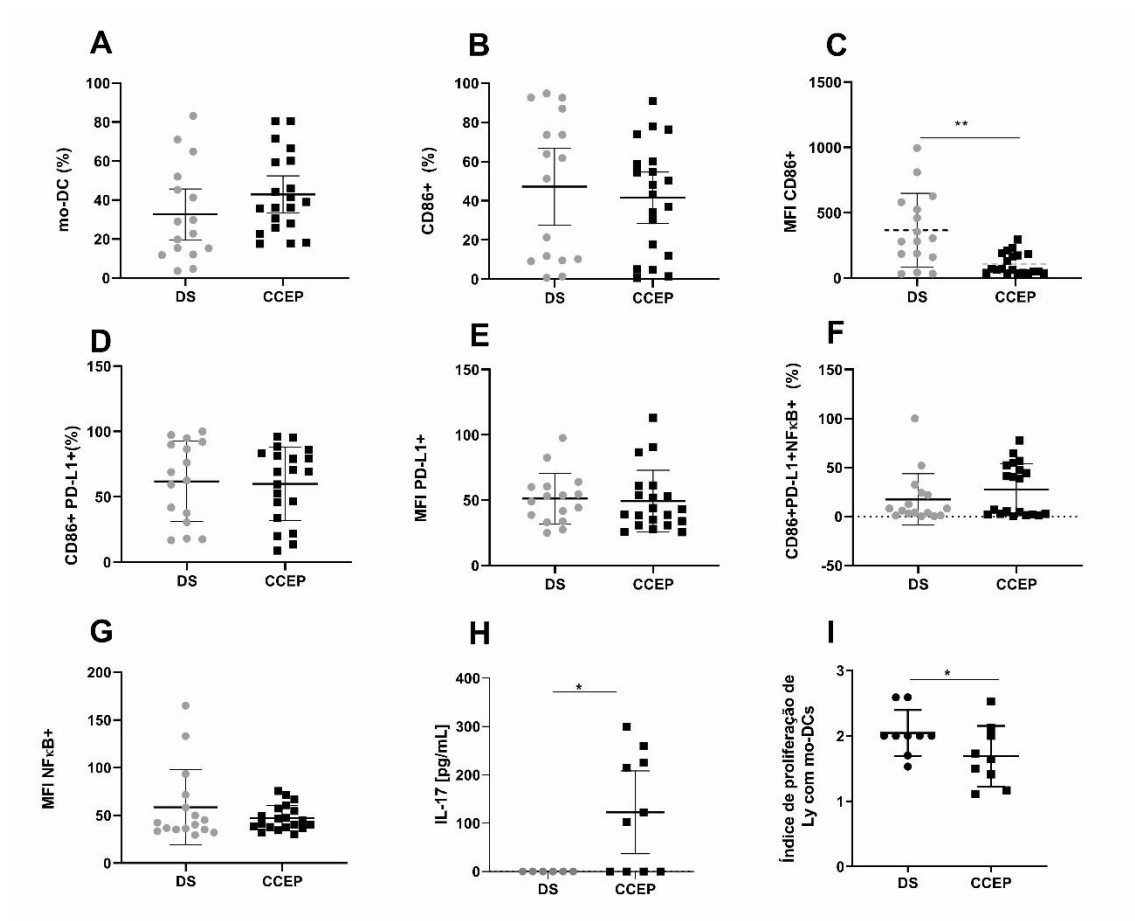


Figura 02. **Falhas fenotípicas e funcionais nas mo-DCs obtidas de pacientes com CCEP.** (A) A morfometria das mo-DCs, (B) a frequência de células CD86+ e (C) a intensidade de fluorescência mediana em mo-DC foram analisadas em pacientes (n=20) e doadores saudáveis (n=16) (*p≤0,003). Em mo-DCs expressando CD86, (D) a co-expressão de células positivas de frequência PD-L1 e (E) intensidade de fluorescência mediana de PD-L1. (F-G) expressão em mo-DCs expressão de células positivas de frequência NFκ-B e (E) intensidade de fluorescência mediana de NFκ-B. (H) Nível de citocina IL-17 no sobrenadante obtido de cultura de pacientes (n=10) ou doadores saudáveis (n=5) mo-DCs. (I) O índice de proliferação de linfócitos alogênicos foi comparado com doadores saudáveis (n=9) ou pacientes (n=9) (*p=0,0456). Os dados foram expressos como média ± DP e utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para comparação dos grupos.

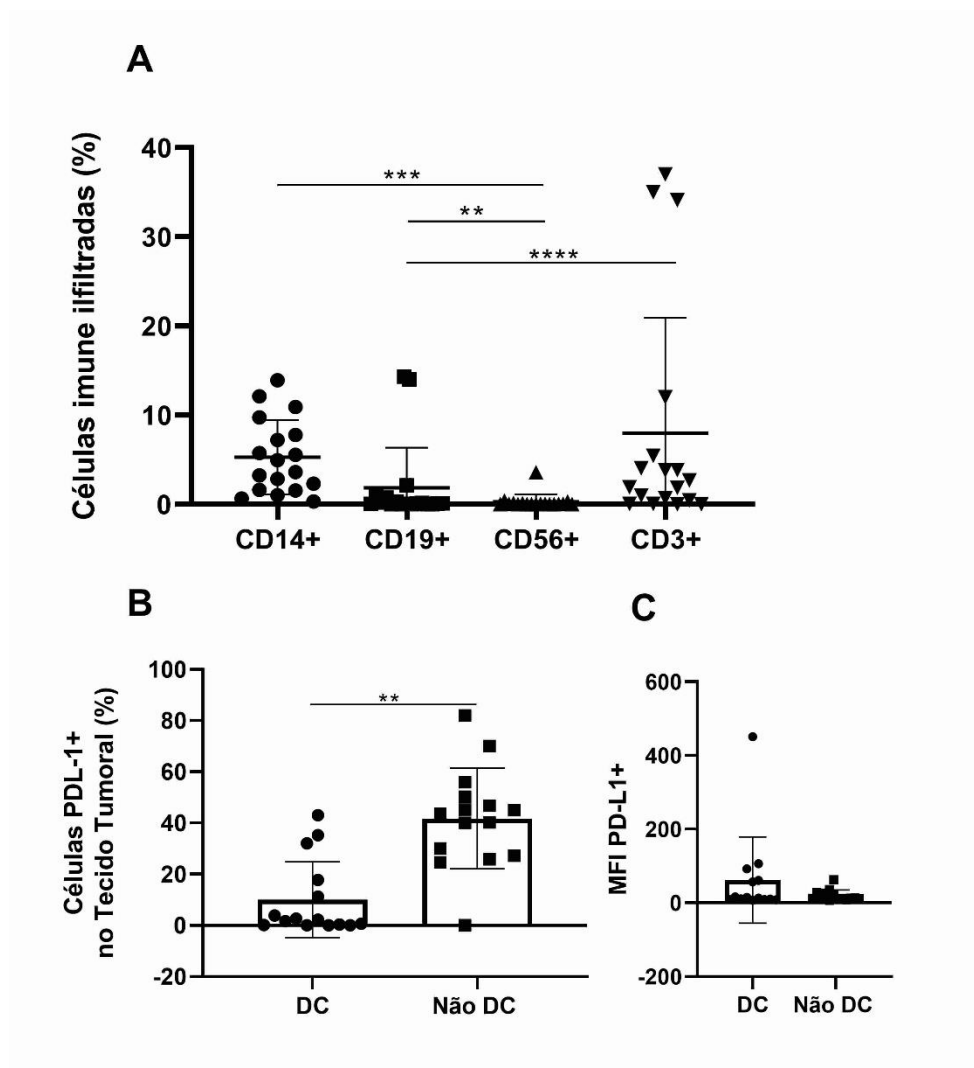


Figura 03. **Tecido tumoral apresenta alto nível de linfócitos e macrófagos e infiltrados e maior expressão da molécula inibitória de resposta imune PDL-1.** (A) Frequencia de células CD14+, CD19+, CD56+, CD3+ (B) Frequência de células CD14-CD86-PDL-1+ e CD14-CD86+PDL-1+ (C) Intensidade média de fluorescência em células CD14-CD86-PDL-1+ e CD14-CD86+PDL-1+, respectivamente, analisados nos tecidos tumorais derivados dos pacientes (n=19) (* $p \leq 0,005$). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP e utilizou-se o teste U de Mann-Whitney, não pareado.

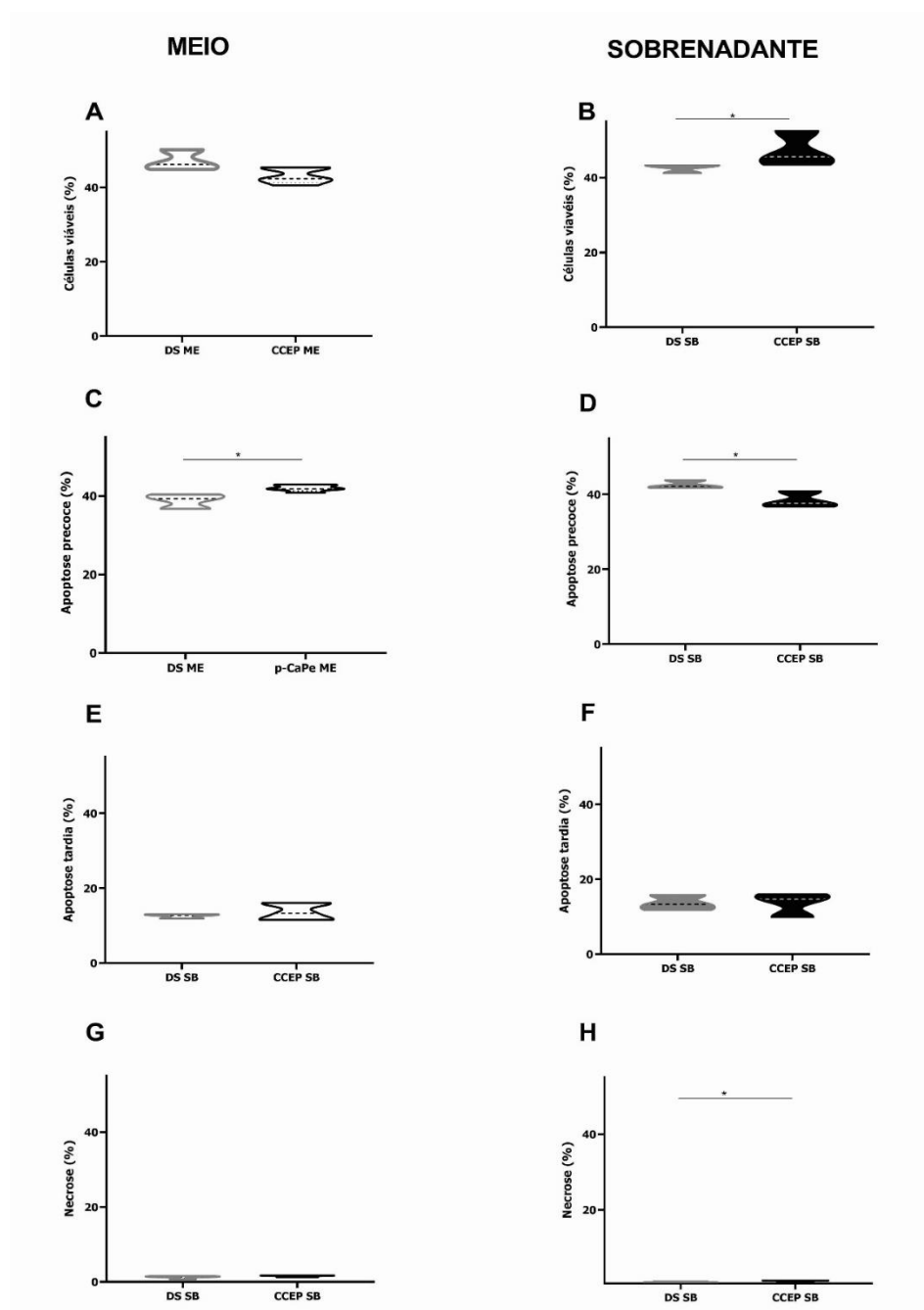


Figura 04. O sobrenadante tumoral melhora a viabilidade dos linfócitos do paciente e induz apoptose em linfócitos de doadores saudáveis. A) As células viáveis cultivadas em presença de meio RPMI apenas (B) As células viáveis cultivadas na presença de meio mas 30% de sobrenadante tumoral de CCEP (C) As células em apoptose precoce cultivadas na presença de meio (D) As células em apoptose precoce cultivadas com sobrenadante tumoral de CCEP (E) As células em apoptose tardia cultivadas na presença de meio (F) As células em apoptose tardia cultivadas com sobrenadante tumoral (G) avaliado a necrose em linfócitos cultivados apenas em meio de cultura (H) análise da necrose em linfócitos cultivados com sobrenadante tumoral. Os dados foram representados pela média e pelo desvio padrão e diferenças significativas determinadas com teste não pareado, unicaudal, Mann Whitney, $*p < 0,05$.

Tabela 1. Correlação entre características clínicas e células imunes no sangue e tumor de pacientes com CCEP.

		TUMOR					SANGUE		PARÂMETROS CLÍNICOS			
Células/ Características		CD3+	CD19+	CD56+	CD14+	DC PD-L1+ CD86+	NÃO DC PD- L1+	Mo-DC CD86+PD- L1+	HPV Status	Grau do Tumor	Estadia mento	Tamanho do tumor
Idade	r	-0,01243	-0,1865	-0,2074	-0,1212	-0,3072	-0,1835	0,4412	0,5744	-0,05162	-0,1131	0,08291
	p	0,483	0,243	0,218	0,327	0,123	0,255	0,087	0,001	0,417	0,318	0,347
Tamanho do tumor	r	-0,05735	-0,2186	-0,3338	-0,6344	0,4044	0,3580	-0,3139	-0,04602	0,4403	0,4338	
	p	0,4209	0,2163	0,1110	0,0065**	0,0758	0,1039	0,1872	0,417	0,030*	0,028*	
Estadiamento	r	0,2443	0,3741	-0,02340	0,02290	0,0764	0,5751	-0,1342	-0,2595	0,4745		
	p	0,222	0,116	0,472	0,476	0,406	0,0349*	0,368	0,149	0,023*		
Grau do Tumor	r	-0,4353	-0,4549	-0,8932	-0,3424	-0,2280	-0,2378	-0,2015	0,01003			
	p	0,092	0,08	<0.001**	0,151	0,245	0,238	0,322	0,484			
Status do HPV	r	0,03922	-0,07845	0,1209	-0,1177	0,3141	-0,1571	0,1426				
	p	0,473	0,420	0,362	0,367	0,149	0,308	0,357				

Estadiamento (pTis- pT1, pT2, pT3,); Grau (I, II, III, IV), Tamanho do Tumor (min=0,7cm; max=15cm), HPV (+/-)

REFERENCIAS ARTIGO

1. Thomas A, Necchi A, Muneer A. et al. Câncer de pênis. *Nat Rev Dis Primers* 7, 11 (2021).
2. Pinho JD, Silva GEB, Teixeira júnior AAL, Belfort MRC, Mendes JM, Cunha IWD, Quintana LG, Calixto JRR, Nogueira LR, Coelho RWP, Khayat AS. MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P Reveals Potential Biomarkers in Penile Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020
3. Macedo J, Silva E, Nogueira L, Coelho R, DA Silva J, dos Santos A, Teixeira-Júnior AA, Belfort M, Silva G, Khayat A, de Oliveira E, dos Santos AP, Cavalli LR, Pereira SR. Genomic profiling reveals the pivotal role of hrHPV driving copy number and gene expression alterations, including mRNA downregulation of TP53 and RB1 in penile cancer. *Mol Carcinog*. 2020 Jun;59(6):604-617. doi: 10.1002/mc.23185. Epub 2020 Mar 24. PMID: 32212199.
4. Leto, MGP, Santos-Junior GF, Porro AM, Tomimori J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [online]. 2011, v. 86, n. 2
5. Steinestel J, AL Ghazal A, Arndt A, Schnoeller TJ, Schrader AJ, Moeller P, Steinestel K. The role of histologic subtype, p16(INK4a) expression, and presence of human papillomavirus DNA in penile squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2015 Apr 3;15:220. doi: 10.1186/S12885-015-1268-Z. PMID: 25885064; PMCID: PMC4392470.
6. Spiess PE, Dhillon J, Baumgarten AS, Johnstone PA, Giuliano AR. Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies. *CA Cancer J Clin*. 2016 Nov 12;66(6):481-495. doi: 10.3322/caac.21354. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27314890.
7. Greenhough, A., Smartt, H.J., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C. Kaidi, A. (2009) The COX-2/PGE 2 Pathway: Key Roles in the Hallmarks of Cancer and Adaptation to the Tumour Microenvironment. *Carcinogenesis*, 30, 377-386. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp014>
8. da Silva MLR, de Albuquerque BHDR, Allyrio TAME, de Almeida VD, Cobucci RNO, Bezerra FL, Andrade VS, Lanza DCF, de Azevedo JCV, DE Araújo JMG, Fernandes JV. The role of HPV-induced epigenetic changes in cervical carcinogenesis (Review). *Biomed Rep*. 2021 Jul;15(1):60. doi: 10.3892/br.2021.1436. Epub 2021 May 20. PMID: 34094536; PMCID: PMC8165754.
9. Ornellas P, Ornellas AA. HPV vaccination is fundamental for reducing or eradicate penile cancer | Opinion: NO. *Int Braz J Urol*. 2018 Sep-Oct;44(5):862-864. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.05.03. PMID: 30325595; PMCID: PMC6237529.
10. Vieira CB, Teixeira-Júnior A, Feitoza L, Pinho J, Calixto J, DO Nascimento FSMS, Campos MAG, Lages J, Junior AMA, Soares F, Cunha I, Silva GEB. A cohort study among 402 patients with penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil with the highest worldwide incidence. *BMC Res Notes*. 2020 Sep 18;13(1):442. doi: 10.1186/s13104-020-05283-z. PMID: 32948228; PMCID: PMC7501695.

11. Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2013 Apr;25(2):261-7. doi: 10.1016/j.coi.2013.03.004. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23579076.
12. Becht E, Giraldo NA, germain c, de reyniès a, laurent-puig p, zucman-rossi j, dieu-nosjean mc, sautès-fridman c, fridman WH. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Adv Immunol.* 2016;130:95-190. doi: 10.1016/bs.ai.2015.12.002. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26923001.
13. Lohneis, P., Boral, Ş., Kaufmann, A.M., Lehmann, A., Schewe, C., Dietel, M., Anagnostopoulos, I., & Jöhrens, K. (2014). Human papilloma virus status of penile squamous cell carcinoma is associated with differences in tumour-infiltrating T lymphocytes. *Virchows Archiv*, 466, 323-331.
14. Chu C, Chen K, Tan X, Lu J, Yang Y, Zhang Y, Yao K, Cao Y. Prevalence of human papillomavirus and implication on survival in Chinese penile cancer. *Virchows Arch.* 2020 Nov;477(5):667-675. doi: 10.1007/s00428-020-02831-7. Epub 2020 May 19. PMID: 32430598
15. Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P. and Bronte, V. (2008), Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunological Reviews*, 222: 162-179.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00602.x>
16. Berghella, A.M., Pellegrini, P., Del Beato, T., Maccarone, D., Adorno, D., & Casciani, C.U. (1996). Prognostic significance of immunological evaluation in colorectal cancer. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 11 6, 355-61 .
17. Uciechowski, P., & Dempke, W. C. M. (2020). Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*, 1–7. doi:10.1159/000505099
18. Minetto P, Guolo F, Pesce S, Greppi M, Obino V, Ferretti E, Sivori S, Genova C, Lemoli RM, Marcenaro E. Harnessing NK Cells for Cancer Treatment. *Front Immunol.* 2019 Dec 6;10:2836. doi: 10.3389/fimmu.2019.02836. PMID: 31867006; PMCID: PMC6908847.
19. Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, Vuletic A, Mirjagic Martinovic K, Radenkovic S, Spuzic I. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. *Immunol Res.* 2012 Apr;52(1-2):139-56. doi: 10.1007/s12026-012-8285-7. PMID: 22442005.
20. Lee H, Jeong AJ, Ye SK. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy. *BMB Rep.* 2019;52(7):415-423. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.7.152
21. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007 Sep 27;449(7161):419-26. doi: 10.1038/nature06175. PMID: 17898760.
22. Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Li Z. Role of chaperones and FcγR in immunogenic death. *Curr Opin Immunol.* 2008 Oct;20(5):512-7. doi: 10.1016/j.coi.2008.05.002. Epub 2008 Jun 21. PMID: 18572395; PMCID: PMC3224819.
23. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1-22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22136168.

24. Lim MS. Re: Correlational of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, by Kim S-H, Cho NH, Kim K, et al. *J Surg Oncol*. 2006 Mar 15;93(4):253-4. doi: 10.1002/jso.20462. PMID: 16496361.
25. Bijker, M., van den Eeden, S., Franken, K., Melief, C., van der Burg, S. and Offringa, R. (2008), Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur. J. Immunol.*, 38: 1033-1042. <https://doi.org/10.1002/eji.200737995>
26. Kim, C.W., Kim, K., & Lee, H. (2020). The role of dendritic cells in tumor microenvironments and their uses as therapeutic targets. *BMB Reports*, 54, 31 - 43.
27. Kim, J. and Kim, Y. (2019) Tumor Endothelial Cells as a Potential Target of Metronomic Chemotherapy. *Archives of Pharmacal Research*, 42, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-01102-z>
28. Kavita M. Dhodapkar, Scott Barbuto, Phillip Matthews, Anjali Kukreja, Amitabha Mazumder, David Vesole, Sundar Jagannath, Madhav V. Dhodapkar; Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood* 2008; 112 (7): 2878–2885. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143222>
29. Ortiz ML, Kumar V, Martner A, Mony S, Donthireddy L, Condamine T, Seykora J, Knight SC, Malietzis G, Lee GH, Moorghen M, Lenox B, Luetkeke N, Celis E, Gabrilovich D. Immature myeloid cells directly contribute to skin tumor development by recruiting IL-17-producing CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2015 Mar 9;212(3):351-67. doi: 10.1084/jem.20140835. Epub 2015 Feb 9. PMID: 25667306; PMCID: PMC4354367.
30. Barilla RM, Diskin B, Caso RC, Lee KB, Mohan N, Buttar C, Adam S, Sekendiz Z, Wang J, Salas RD, Cassini MF, Karlen J, Sundberg B, Akbar H, Levchenko D, Gakhil I, Gutierrez J, Wang W, Hundeyin M, Torres-Hernandez A, Leinwand J, Kurz E, Rossi JAK, Mishra A, Liria M, Sanchez G, Panta J, Loke P, Aykut B, Miller G. Specialized dendritic cells induce tumor-promoting IL-10+IL-17+ FoxP3neg regulatory CD4+ T cells in pancreatic carcinoma. *Nat Commun*. 2019 Mar 29;10(1):1424. doi: 10.1038/s41467-019-09416-2. PMID: 30926808; PMCID: PMC6441038.
31. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. Cancer Immunology. The "cancer immunogram". *Science*. 2016 May 6;352(6286):658-60. doi: 10.1126/science.aaf2834. PMID: 27151852.
32. Clouston D, Hall A, Lawrentschuk N. Penile lichen sclerosis (balanitis xerotica obliterans). *BJU Int*. 2011 Nov;108 Suppl 2:14-9. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10699.x. PMID: 22085120.
33. Zemek RM, Chin WL, Nowak AK, Millward MJ, Lake RA, Lesterhuis WJ. Sensitizing the Tumor Microenvironment to Immune Checkpoint Therapy. *Front Immunol*. 2020 Feb 18;11:223. doi: 10.3389/fimmu.2020.00223. PMID: 32133005; PMCID: PMC7040078.
34. Cocks M, Taheri D, Ball MW, Bezerra SM, Del Carmen Rodriguez M, Ricardo BFP, Bivalacqua TJ, Sharma RB, Meeker A, Chaux A, Burnett AL, Netto GJ. Immune-checkpoint status in penile squamous cell carcinoma: a North American

cohort. Hum Pathol. 2017 Jan;59:55-61. doi: 10.1016/j.humpath.2016.09.003.
Epub 2016 Sep 20. PMID: 27663086.

6. CONCLUSÃO DA TESE

As citocinas IL-4, IL-6, TNF, INF não são marcadores sistêmicos nas amostras de plasma avaliadas nesse estudo.

Dados in vitro mostraram que as células dos pacientes são menos eficientes na geração de DCs maduras, reduzindo a eficiência de ativação de linfócitos, também observado o efeito imunossupressor com o microambiente tumoral.

Os achados de células imunes infiltrantes no CCEP sugerem um tumor inflamatório capaz de subverter a resposta imune ao padrão Th2/Th17, reduzindo a resposta imune efetora contra o tumor.

Fatores solúveis presentes no sobrenadante tumoral de CCEP interfere na viabilidade e apoptose dos linfócitos de pacientes.

REFERENCIAS TESE

ABREU, APA. A influência do tabagismo na infecção por HPV no desenvolvimento do câncer de pênis: estudos clínicos. 2020. 118 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2020.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2018. Atlanta, GA, 2018.

Aotsuka A, Matsumoto Y, Arimoto T, Kawata A, Ogishima J, Taguchi A, Tanikawa M, Sone K, Mori-Uchino M, Tsuruga T, Oda K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. Interleukin-17 is associated with expression of programmed cell death 1 ligand 1 in ovarian carcinoma. *Cancer Sci.* 2019 Oct;110(10):3068-3078. doi: 10.1111/cas.14174. Epub 2019 Sep 24. PMID: 31432577; PMCID: PMC6778630.

BACKES DM, BOSIRE C, HUDGENS MG, FOKAR A, AGOT K, OPIYO F, MOSES S, MEIJER CJ, BAILEY RC, SNIJDERS PJ, SMITH JS. Incidence and clearance of penile human papillomavirus infection among circumcised Kenyan men. *Int J STD AIDS.* 2020 Oct;31(12):1202-1211. doi: 10.1177/0956462420948370. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32928051.

BANDINI M, AHMED M, BASILE G, et al. A global approach to improving penile cancer care [published online ahead of print, 2021 Dec 22] [published correction appears in *Nat Rev Urol.* 2022 Jan 18;:]. *Nat Rev Urol.* 2021;1-9. doi:10.1038/s41585-021-00557-y

BARATIN M, FORAY C, DEMARIA O, HABBEDDINE M, POLLET E, MAURIZIO J, VERTHUY C, DAVANTURE S, AZUKIZAWA H, FLORES-LANGARICA A, DALOD M, LAWRENCE T. Homeostatic NF- κ B Signaling in Steady-State Migratory Dendritic Cells Regulates Immune Homeostasis and Tolerance. *Immunity.* 2015 Apr 21;42(4):627-39. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.003. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25862089.

BOGUSLAWSKA J, KRYST P, POLETAJEWSKI S, PIEKIELKO-WITKOWSKA A. TGF- β and microRNA Interplay in Genitourinary Cancers. *Cells.* 2019 Dec 12;8(12):1619. doi: 10.3390/CELLS8121619. PMID: 31842336; PMCID: PMC6952810.

BRASIL, 2018. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Secretaria de Atenção à Saúde. Glossário temático: saúde do homem [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Secretaria de Atenção à Saúde.– Brasília.

BRIERLEY JD, GOSPODAROWICZ MK, WITTEKIND C. TNM classification of malignant tumours. Union for International Cancer Control; Oxford: John Wiley & Sons 2017.

BROZ ML, BINNEWIES M, BOLDAJIPOUR B, NELSON AE, POLLACK JL, ERLE DJ, et al. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell.*

BRÜNDL J, NEPL C, HOMMER T, OTTO W, BREYER J, BROOKMAN-MAY S, WEBER F, BURGER M, MAY M, EICHELBERG C. Bedeutung von p16(INK4A) hinsichtlich des Nachweises von HPV-DNA und in der Stratifizierung der

tumorspezifischen Mortalität bei 34 Patienten mit invasivem Peniskarzinom in Langzeit-Nachbeobachtung [Role of p16(INK4A) in detection of human papillomavirus DNA and stratification of cancer-specific mortality on the basis of long term follow-up data of 34 patients with invasive penile cancer]. *Aktuelle Urol.* 2019 Sep;50(5):491-501. German. doi: 10.1055/a-0664-0316. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30227445.

BURT LM, SHRIEVE DC, TWARD JD. Stage presentation, care patterns, and treatment outcomes for squamous cell carcinoma of the penis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014;88:94-100.

BUSS, P. M.; PELLEGRINI FILHO, A. A Saúde e seus Determinantes Sociais. In *PHYSIS: Rev. Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 17(1): 77-93, 2007.

C PROTZEL , PE SPIESS. Molecular research in penile cancer - lessons learned from the past and the bright horizons of the future? *Int J Mol Sci* , 14 (10) (2013) , pp . 19494-19505

CASCO NC, CARMONA MJ, SOTO ÁJ. Therapeutic and Surgical Indications for Patients with Penile Cancer in the COVID-19 era. *Int Braz J Urol.* 2020 Jul;46(suppl.1):86-92. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.S110. PMID: 32568497; PMCID: PMC7719983.

CASWELL DR, SWANTON C. The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome. *BMC Med* [Onlinel. 2017 [Cited 2021 Jan 30];15(1):1-9.Available from: <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0900-y>. English.

CATLEY MC, CHIVERS JE, CAMBRIDGE LM, HOLDEN N, SLATER DM, STAPLES KJ, BERGMANN MW, LOSER P, BARNES PJ AND NEWTON R. IL-1beta-dependent activation of NF-kappaB mediates PGE₂ release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Lett*2003

CHAHOU, J.; NETTO, F.; SEGURA, R.L.; CUENTAS, E.R.P.; LU, X.; RAO, P.; WISTUBA, I.I.; PICKERING, C.R.; PETTAWAY, C.A. Tumor immune microenvironment alterations in penile squamous cell carcinoma using multiplex immunofluorescence and image analysis approaches. *J. Clin. Oncol.* 2020, 38, 4.

COPPE JP, DESPREZ PY, KRTOLICA A & CAMPISI J. O fenótipo secretor associado à senescência: o lado escuro da supressão tumoral . *Anu. Rev. Pathol .* 5 , 99-118 (2010).

COUTO TC, ARRUDA RM, COUTO MC, BARROS FD. Estudo epidemiológico do câncer de pênis em Pernambuco: experiência de dois centros de referência. *International braz j urol: revista oficial da Sociedade Brasileira de Urologia* 2014 40 :6 (738-744)

DAVIDSSON S, CARLSSON J, GIUNCHI F, HARLOW A, KIRRANDER P, RIDER J, FIORENTINO M, ANDRÉN O. PD-L1 Expression in Men with Penile Cancer and its Association with Clinical Outcomes. *Eur Urol Oncol.* 2019 Mar;2(2):214-221. doi: 10.1016/j.euo.2018.07.010. Epub 2018 Aug 23. PMID: 31017099.

DE BACCO MW, CARVALHAL GF, MACGREGOR B, MARÇAL JMB, WAGNER MB, SONPAVDE GP, FAY AP. PD-L1 and p16 Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma From an Endemic Region. *Clin Genitourin Cancer.* 2020 Jun;18(3):e254-e259. doi: 10.1016/j.clgc.2019.10.014. Epub 2019 Oct 16. PMID: 32139302.

DE ROSE AF, MANTICA G, GALLO F, DOTTA F, TESTINO N, VAN DER MERWE A, TERRONE C. Risk factors for the delay in the diagnosis of penile lesions: results from a single center in Italy. *Minerva Urol Nefrol*. 2019 Jun;71(3):258-263. doi: 10.23736/S0393-2249.18.03189-2. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30203937.

DHILLON AS, HAGAN S, RATH O, KOLCH W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26:3279–3290.

DIAS J.P., CARVALHO S., AZEVEDO R., OLIVEIRA J., MAURÍCIO J. Penile carcinoma in a comprehensive cancer center in Portugal - A retrospective descriptive cohort study *European Urology, Supplements* 2017 16:10 (e2826-)

DJAJADININGRAT RS, GRAAFLAND NM, VAN WERKHOVEN E, MEINHARDT W, BEX A, VAN DER POEL HG, VAN BOVEN HH, VALDÉS OLMOS RA, HORENBLAS S. Contemporary management of regional nodes in penile cancer- improvement of survival? *J Urol*. 2014 Jan;191(1):68-73. doi: 10.1016/j.juro.2013.07.088. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23917166.

DOUGLAWI, A. & MASTERSON, T. A. Penile cancer epidemiology and risk factors: a contemporary review. *Curr. Opin. Urol*. 29, 145–149 (2019).

DUNN, G., BRUCE, A., IKEDA, H. et al. Imunoedição do câncer: da imunovigilância ao escape tumoral. *Nat Immunol* 3 , 991-998 (2002). <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>

FAN Y, MAO R, YANG J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*. 2013 Mar;4(3):176-85. doi: 10.1007/s13238-013-2084-3. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23483479; PMCID: PMC4875500.

FERRANTINI M., CAPONE I, AND BELARDELLI F. Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008. 19(1): p. 93-107.

FU C, JIANG A. Dendritic Cells e CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Frente. Immunol*. 2018; 9 doi: 10.3389/fimmu.2018.03059.

Gabrilovich and H. Andy. 2008: Springer.

GAJEWSKI TF, SCHREIBER H, FU YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):1014-22. doi: 10.1038/ni.2703. PMID: 24048123; PMCID: PMC4118725.

GARDNER A, RUFFELL B. Células dendríticas e imunidade ao câncer. *Tendências Immunol* . (2016) 37 :855-65. 10.1016/j.it.2016.09.006

GARRIS CS, ARLAUCKAS SP, KOHLER RH, TREFNY MP, GARREN S, PIOT C, et al. . A imunoterapia de câncer anti-PD-1 bem-sucedida requer crosstalk entre células T e células dendríticas envolvendo as citocinas IFN- γ e IL-12 . *Imunidade* . (2018) 49 :1148–61 e7. 10.1016/j.immuni.2018.09.024

GRAHAM SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Aug 10;131(17):2201-2221. doi: 10.1042/CS20160786. PMID: 28798073.

GRETEN FR, GRIVENNIKOV SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019 Jul 16;51(1):27-41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025. PMID: 31315034; PMCID: PMC6831096.

HAKENBERG O.W.COMPÉRAT E. MINHAS S.NECCHI A.PROTZEL C.WATKIN N.ROBINSON R. European Association of Urology Guidelines: penile cancer. Uroweb website.<https://uroweb.org/guideline/penile-cancer/>

HAKENBERG OW, DRÄGER DL, ERBERSDOBLER A, NAUMANN CM, JÜNEMANN KP, PROTZEL C. The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer. *Dtsch Arztebl Int.* 2018 Sep 28;115(39):646-652. doi: 10.3238/arztebl.2018.0646. PMID: 30375327; PMCID: PMC6224543.

HAKENBERG OW, DRÄGER DL, ERBERSDOBLER A, NAUMANN CM, JÜNEMANN KP, PROTZEL C. The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer. *Dtsch Arztebl Int.* 2018 Sep 28;115(39):646-652. doi: 10.3238/arztebl.2018.0646. PMID: 30375327; PMCID: PMC6224543.

HANAHAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.

HAVARD L, DELVENNE P, FRARE P, BONIVER J AND GIANNINI SL. Differential production of cytokines and activation of NF- κ B in HPV transformed KERATINOCYTES. *VIROLOGY* 298: 271-285, 2002.

HEBNES JB, MUNK C, FREDERIKSEN K, JOERGENSEN HO, IFTNER T, KJAER SK. The role of circumcision, tobacco, and alcohol use in genital human papillomavirus infection among men from Denmark. *Int J STD AIDS.* 2021 Oct;32(11):1028-1035. doi: 10.1177/09564624211014727. Epub 2021 May 12. PMID: 33978528.

HOEKSTRA RJ, TRIP EJ, TEN KATE FJ, HORENBLAS S, LOCK MT. Penile intraepithelial neoplasia: Nomenclature, incidence and progression to malignancy in the Netherlands. *Int J Urol.* 2019 Mar;26(3):353-357. doi: 10.1111/iju.13871. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30508877.

HUYNH J, CHAND A, GOUGH D, ERNST M. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map. *Nat Rev Cancer.* 2019 Feb;19(2):82-96. doi: 10.1038/s41568-018-0090-8. PMID: 30578415.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JARNICKI AG, CONROY H, BRERETON C, DONNELLY G, TOOMEY D, WALSH K, SWEENEY C, LEAVY O, FLETCHER J, LAVELLE EC, DUNNE P, MILLS KH. Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):3797-806. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.3797. PMID: 18322186.

JOSHI, V.B., SPIESS, P.E., NECCHI, A. et al. Immune-based therapies in penile cancer. *Nat Rev Urol* 19, 457–474 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41585-022-00617-x>

JÚNIOR PFM, SILVA EHV, MOURA KL, DE AQUINO YF, WELLER M. Increased Risk of Penile Cancer among Men Working in Agriculture. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 Jan 27;19(1):237-241. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.1.237. PMID: 29374407; PMCID: PMC5844624.

- KIMURA A , KISHIMOTO T. IL-6: regulador do equilíbrio Treg/Th17 . Eur J Immunol . 2010 ; 40 : 1830-1835
- KOJIMA S, KAWANA K, TOMIO K, YAMASHITA A, TAGUCHI A, MIURA S, et al. The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN. Am J Reprod Immunol. 2013;69(2):134-41
- KORKES F, RODRIGUES AFS, BACCAGLINI W, CUNHA FTS, SLONGO J, SPIESS P, GLINA S. Penile cancer trends and economic burden in the Brazilian public health system. Einstein (Sao Paulo). 2020 Nov 6;18:eAO5577. doi: 10.31744/einstein_journal/2020AO5577. PMID: 33174969; PMCID: PMC7607917.
- KWON WA, YOON MY, KIM SH, SEO HK, CHUNG J, LEE KH, JOUNG JY, PARK WS. Single-Center Analysis of Human Papillomavirus Infection and P16INK4A Expression among Korean Patients with Penile Cancer. Biomed Res Int. 2019 Mar 26;2019:6940582. doi: 10.1155/2019/6940582. PMID: 31032357; PMCID: PMC6457309.
- LAI WC, ZHOU M, SHANKAVARAM U, PENG G, WAHL LM. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. J Immunol. 2003 Jun 15;170(12):6244-9. doi: 10.4049/jimmunol.170.12.6244. PMID: 12794156.
- LAMY E, GOETZ V, ERLACHER M, HERZ C, MERSCH-SUNDERMANN V. hTERT: Outro tijolo na parede das células cancerosas. Mut Res. 2013; 752 :119-128. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.
- LARKE, NL, THOMAS, SL, DOS SANTOS SILVA, I. & WEISS, HA. Male circumcision and penile cancer: a systematic review and meta-analysis. Cancer Causes Control 22, 1097–1110 (2011).
- LEE H, JEONG AJ, YE SK. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy. BMB Rep. 2019;52(7):415-423. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.7.152
- LEE YS, LEE CW, SONG MJ, et al. Cell-mediated immune response to human papillomavirus 16 E7 peptide pools in patients with cervical neoplasia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2011;90:1350–1356.
- LETENDRE J, SAAD F, LATTOUF JB. Penile cancer: what's new? Curr Opin Support Palliat Care. 2011 Sep;5(3):185-91. doi: 10.1097/SPC.0b013e32834903d9. PMID: 21826001
- LI ZS, YAO K, CHEN P, WANG B, CHEN JP, MI QW, LI YH, LIU ZW, QIN ZK, ZHOU FJ, HAN H. Modification of N staging systems for penile cancer: a more precise prediction of prognosis. Br J Cancer. 2015 May 26;112(11):1766-71. doi: 10.1038/bjc.2015.141. Epub 2015 May 5. Erratum in: Br J Cancer. 2015 Dec 22;113(12):1746. PMID: 25942394; PMCID: PMC4647243.
- LOPES A, HIDALGO GS, KOWALSKI LP, TORLONI H, ROSSI BM, FONSECA FP. Prognostic factors in carcinoma of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. J Urol 1996; 156:1637-42.

MACEDO J, SILVA E, NOGUEIRA L, COELHO R, DA SILVA J, DOS SANTOS A, TEIXEIRA-JÚNIOR AA, BELFORT M, SILVA G, KHAYAT A, DE OLIVEIRA E, DOS SANTOS AP, CAVALLI LR, PEREIRA SR. Genomic profiling reveals the pivotal role of hrHPV driving copy number and gene expression alterations, including mRNA downregulation of TP53 and RB1 in penile cancer. *Mol Carcinog*. 2020 Jun;59(6):604-617. doi: 10.1002/mc.23185. Epub 2020 Mar 24. PMID: 32212199.

MACEDO J, SILVA E, NOGUEIRA L, COELHO R, DA SILVA J, DOS SANTOS A, TEIXEIRA-JÚNIOR AA, BELFORT M, SILVA G, KHAYAT A, DE OLIVEIRA E, DOS SANTOS AP, CAVALLI LR, PEREIRA SR. Genomic profiling reveals the pivotal role of hrHPV driving copy number and gene expression alterations, including mRNA downregulation of TP53 and RB1 in penile cancer. *Mol Carcinog*. 2020 Jun;59(6):604-617. doi: 10.1002/mc.23185. Epub 2020 Mar 24. PMID: 32212199.

MARTINS VA, PINHO JD, TEIXEIRA JÚNIOR AAL, NOGUEIRA LR, SILVA FF, MAULEN VE, KHAYAT AS, CALIXTO JRR, COSTA HA, RAMALHO LNZ, SILVA GEB. P16INK4a expression in patients with penile cancer. *PLoS One*. 2018 Oct 12;13(10):e0205350. doi: 10.1371/journal.pone.0205350. PMID: 30312320; PMCID: PMC6185731.

MARTINS VDCA, CUNHA IW, FIGLIUOLO G, RONDON HHMF, DE SOUZA PM, TORRES SILVA FL, TORRES SILVA GL, DE SOUZA BASTOS M, DE CASTRO DB, SANTANA MF, RAMASAWMY R, LEVI JE, TORRES KL. Presence of HPV with overexpression of p16INK4a protein and EBV infection in penile cancer-A series of cases from Brazil Amazon. *PLoS One*. 2020 May 6;15(5):e0232474. doi: 10.1371/journal.pone.0232474. PMID: 32374757; PMCID: PMC7202603.

MARTINS VDCA, CUNHA IW, FIGLIUOLO G, RONDON HHMF, DE SOUZA PM, TORRES SILVA FL, TORRES SILVA GL, DE SOUZA BASTOS M, DE CASTRO DB, SANTANA MF, RAMASAWMY R, LEVI JE, TORRES KL. Presence of HPV with overexpression of p16INK4a protein and EBV infection in penile cancer-A series of cases from Brazil Amazon. *PLoS One*. 2020 May 6;15(5):e0232474. doi: 10.1371/journal.pone.0232474. PMID: 32374757; PMCID: PMC7202603.

MEZACHE L, PANICCIA B, NYINAWABERA A, NUOVO GJ. Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. *Mod Pathol*. 2015;28(12):1594- 602

MILDNER, A.; JUNG, S. Desenvolvimento e função de subconjuntos de células dendríticas. *Immunity* 2014 , 40 , 642-656.

MILLER J, DAKIC A, CHEN R, PALECHOR-CERON N, DAI Y, KALLAKURY B, SCHLEGEL R, LIU X. A proteína HPV16 E7 e as proteínas hTERT defeituosas para manutenção dos telômeros cooperam para imortalizar os queratinócitos humanos. *PLoS Pathog*. 2013; 9(4) :e1003284. doi: 10.1371/journal.ppat.1003284.

MOCH H, AMIN MB, BERNEY DM, COMPÉRAT EM, GILL AJ, HARTMANN A, MENON S, RASPOLINI MR, RUBIN MA, SRIGLEY JR, HOON TAN P, TICKOO SK, TSUZUKI T, TURAJLIC S, CREE I, NETTO GJ. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2022 Nov;82(5):458-468. doi: 10.1016/j.eururo.2022.06.016. Epub 2022 Jul 16. PMID: 35853783.

- MOHME M. Circulating and disseminated tumour cells-mechanisms of immune surveillance and escape. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(3):155-167.
- MONTES CARDONA CE, GARCÍA-PERDOMO HA. Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. *Rev Panam Salud Publica* 2017; 41:e117.
- MORRISON AH, BYRNE KT, VONDERHEIDE RH. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends Cancer*. 2018 Jun;4(6):418-428. doi: 10.1016/j.trecan.2018.04.001. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29860986; PMCID: PMC6028935.
- MOSCONI AM, ROILA F, GATTA G, THEODORE C. Cancer of the penis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2005;53(2):165-77. Epub 2005/01/22.
- MULHERKAR R, HASAN S, WEGNER RE, VERMA V, GLASER SM, KALASH R, BERIWAL S, HORNE ZD. National patterns of care for early-stage penile cancers in the United States: How is radiation and brachytherapy utilized? *Brachytherapy*. 2019 Jul-Aug;18(4):503-509. doi: 10.1016/j.brachy.2019.04.007. Epub 2019 May 22. PMID: 31126857.
- MÜLLER T, DEMES M, LEHN A, KÖLLERMANN J, VALLO S, WILD PJ, WINKELMANN R. The peri- and intratumoral immune cell infiltrate and PD-L1 status in invasive squamous cell carcinomas of the penis. *Clin Transl Oncol*. 2022 Feb;24(2):331-341. doi: 10.1007/s12094-021-02694-7. Epub 2021 Aug 27. PMID: 34449004; PMCID: PMC8794908.
- NESPOLI, NS; VIEIRA, BM; BERTOLDI, LF e PAIVA, MP. A penectomia e seus efeitos sobre a questão da masculinidade. *Trivium [online]*. 2020, vol.12, n.1 [citado 2022-01-17], pp. 53-67 . Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-48912020000100006&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 2176-4891. <http://dx.doi.org/10.18379/2176-4891.2020v1p.53>.
- OLESEN, TB. et al. Prevalence of human papillomavirus DNA and p16(INK4a) in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 20, 145–158 (2019).
- PANER GP, STADLER WM, HANSEL DE, MONTIRONI R, LIN DW, AMIN MB. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. *European urology*. 2018;73(4):560-9.
- PEKAREK L, ORTEGA MA, FRAILE-MARTINEZ O, GARCÍA-MONTERO C, CASANOVA C, SAEZ MA, GARCÍA-HONDUVILLA N, ALVAREZ-MON M, BUJÁN J, DIEZ-NICOLAS V, BURGOS JF, GOMEZ DOS SANTOS V. Clinical and Novel Biomarkers in Penile Carcinoma: A Prospective Review. *J Pers Med*. 2022 Aug 24;12(9):1364. doi: 10.3390/jpm12091364. PMID: 36143149; PMCID: PMC9502223.
- PFEIFER, GP. et al. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, 2002. 21, 7435–7451
- PHILIPPOU P, SHABBIR M, MALONE P, NIGAM R, MUNEEER A, RALPH DJ, et al. Conservative surgery for squamous cell carcinoma of the penis: Resection margins and long-term oncological control. *J Urol* 2012;188:803-8.

PINHO JD, SILVA GEB, TEIXEIRA JÚNIOR AAL, BELFORT MRC, MENDES JM, CUNHA IWD, QUINTANA LG, CALIXTO JRR, NOGUEIRA LR, COELHO RWP, KHAYAT AS. MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P Reveals Potential Biomarkers in Penile Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020 Feb 1;21(2):391-397. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.2.391. PMID: 32102516; PMCID: PMC7332144.

POOREBRAHIM M, ABAZARI MF, SADEGHI S, MAHMOUDI R, KHEIROLLAHI, HASSAN ASKARI A, WICKSTRÖM SL, POORTAHMASEBI V, LUNDQVIST A, KIESSLING R, CID-ARREGUI A. Genetically modified immune cells targeting tumor antigens, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 214, 2020, 107603. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107603>

PUBLIC HEALTH ENGLAND. National Cancer Intelligence Network. Cancer by deprivation in England. Incidence, 1996-2010. Mortality, 1997-2011. London: PHE; 2014.

ROZHOK A & DEGREGORI J. Uma teoria generalizada da carcinogênese dependente da idade . *eLife* 8 , e39950 (2019).

SALVIONI R, NECCHI A, PIVA L, COLECCHIA M, NICOLAI N. Penile cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 2009: Elsevier.

SHURIN MR, CHATTA GS. Tumor Induced Immune Suppression, ed. D.I.

SILVA JD, NOGUEIRA L, COELHO R, DEUS A, KHAYAT A, MARCHI R, OLIVEIRA E, SANTOS APD, CAVALLI L, PEREIRA S. HPV-associated penile cancer: Impact of copy number alterations in miRNA/mRNA interactions and potential druggable targets. *Cancer Biomark*. 2021;32(2):147-160. doi: 10.3233/CBM-210035. PMID: 34151841.

SIRITHANAPHOL W, SOOKPRASERT A, ROMPSAITHONG U, KIATSOPIT P, WIRASORN K, CHINDAPRASIRT J. Prognostic Factors for Penile Cancer and Survival in Response to Multimodality Therapy. *Res Rep Urol*. 2020 Feb 12;12:29-34. doi: 10.2147/RRU.S238147. PMID: 32104668; PMCID: PMC7024792.

SONG D, LI H, LI H, DAI J. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. *Oncology Letters*. 2015;10(2):600-606.

SPITKOVSKY D, HEHNER SP, HOFMANN TG, MOLLER A AND SCHMITZ ML. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- κ B activation by targeting I κ B kinase complex. *J Biol Chem* 277: 25576-25582, 2002.

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

SVAHN MF, MUNK C, VON BUCHWALD C, FREDERIKSEN K, KJAER SK. Burden and incidence of human papillomavirus-associated cancers and precancerous lesions in Denmark. *Scand J Public Health*. 2016;44:551–9. doi: 10.1177/1403494816653669.

- SYRJANEN S, NAUD P, SARIAN L, DERCHAIN S, ROTELI-MARTINS C, LONGATTOFILHO A, et al. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in highgrade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. *Virchows Arch.* 2009;455(6):505- 15.
- TANAKA K, KANDORI S, NITTA S, CHIHARA I, KOJO K, NAGUMO Y, KIMURA T, KOJIMA T, KAWAI K, OKUYAMA A, HIGASHI T, NISHIYAMA H. Characteristics of penile cancer in Japan: An analysis of nationwide hospital-based cancer registry data. *Int J Urol.* 2020 Jun;27(6):538-542. doi: 10.1111/iju.14247. Epub 2020 Apr 19. PMID: 32307745.
- THOMAS, A, NECCHI, A, MUNEER, A. et al. Câncer de pênis. *Nat Rev Dis Primers* 7, 11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00246-5>
- TORBRAND C, WIGERTZ A, DREVIN L, FOLKVALJON Y, LAMBE M, HAKANSSON U. Fatores socioeconômicos e risco e mortalidade por câncer de pênis; um estudo de base populacional. *BJU Int.* 2017; 119 :254-60. doi: 10.1111/bju.13534.
- TORBRAND C, WIGERTZ A, DREVIN L, FOLKVALJON Y, LAMBE M, HÅKANSSON U, KIRRANDER P. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality; a population-based study. *BJU Int.* 2017 Feb; 119(2):254-260.
- UDAGER AM, LIU TY, SKALA SL, MAGERS MJ, MCDANIEL AS, SPRATT DE, FENG FY, SIDDIQUI J, CAO X, FIELDS KL et al. Frequent PD-L1 expression in primary and metastatic penile squamous cell carcinoma: Potential opportunities for immunotherapeutic approaches. *Ann. Oncol.* 2016, 27, 1706–1712
- VALENT P, BONNET D, WÖHRER S, ANDREEFF M, COPLAND M, CHOMIENNE C, et al. Heterogeneity of neoplastic stem cells: Theoretical, functional, and clinical implications. *Cancer Res.* 2013;73:1037-1045.
- VANTHOOR, J, VOS, G, & ALBERSEN, M. Penile cancer: potential target for immunotherapy? *World Journal of Urology.* (2020). doi:10.1007/s00345-020-03510-7
- VANTHOOR, J., VOS, G. & ALBERSEN, M. Penile cancer: potential target for immunotherapy?. *World J Urol* 39, 1405–1411 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00345-020-03510-7>
- WANG D, DUBOIS RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(3):181-193. doi:10.1038/nrc2809
- WANG, TL., LING, M., SHIH, IM. et al. Intramuscular administration of E7-transfected dendritic cells generates the most potent E7-specific anti-tumor immunity. *Gene Ther* 7, 726–733 (2000). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301160>
- WANG, K. et al. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity* 41, 1052–1063 (2014).
- WANICK FB, TEICHNER TC, SILVA R, MAGNANINI MM, AZEVEDO LM. Squamous cell carcinoma of the penis: clinicopathologic study of 34 cases. *An Bras Dermatol* 2011
- WEIL R, SCHWAMBORN K, ALCOVER A, BESSIA C, DI BARTOLO V, ISRAËL A. Induction of the NF-kappaB cascade by recruitment of the scaffold molecule NEMO

to the T cell receptor. *Immunity*. 2003 Jan;18(1):13-26. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00506-x. PMID: 12530972.

WEIL R, SCHWAMBORN K, ALCOVER A, BESSIA C, DI BARTOLO V, ISRAËL A. Induction of the NF-kappaB cascade by recruitment of the scaffold molecule NEMO to the T cell receptor. *Immunity*. 2003 Jan;18(1):13-26. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00506-x. PMID: 12530972.

WONG YNS, JOSHI K, PULE M, PEGGS KS, QUEZADA CSSA, LINCH M. Evolving adoptive cellular therapies in urological malignancies. *The Lancet Oncology* (2017);18: e341–53

YAO Y, CHEN S, CAO M, FAN X, YANG T, HUANG Y, et al. Antigen-specific CD8+ T cell feedback activates NLRP3 inflammasome in antigen-presenting cells through perforin. *Nat Commun [Online]*. 2017 [Cited 2021 Feb 22];8:e15402.

Yorita, K, Kuroda, N, Naroda, T, Tamura, M, Ohe, C, Divatia, M, Amin, M B, Cubilla, A L, Kazakov, D V, Hes, O, Michal, M & Michal, M (2018) *Histopathology* 72, 867–873. <https://doi.org/10.1111/his.13438> Penile warty mucoepidermoid carcinoma with features of stratified mucin-producing intra-epithelial lesion and invasive stratified mucin-producing carcinoma

ZBAR AP. The immunology of colorectal cancer. *Surg Oncol*, 2004. 13(2-3): p. 45-53.

ZEQUI, SD et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer. A multicenter study. *J. Sex. Med.* doi:10.1111/j.1743-6109.2011.02512.x

ZHANG J, BURN C, YOUNG K, WILSON M, LY K, BUDHWANI M, TSCHIRLEY A, BRAITHWAITE A, BAIRD M, HIBMA M. Microparticles produced by human papillomavirus type 16 E7-expressing cells impair antigen presenting cell function and the cytotoxic T cell response. *Sci Rep*. 2018 Feb 5;8(1):2373. doi: 10.1038/s41598-018-20779-2. PMID: 29402982; PMCID: PMC5799164.

ZHANG Y, WANG ZC, ZHANG ZS, CHEN F. MicroRNA-155 regulates cervical cancer via inducing Th17/Treg imbalance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Jun;22(12):3719-3726. doi: 10.26355/eurrev_201806_15251. PMID: 29949145.

ANEXOS

Anexo 1: Termo de consentimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES

Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa “**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA e PROTEICA EM CÂNCER PENIANO**”.

Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender bem peça mais esclarecimento e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as suas dúvidas.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

O aparecimento de tumor no pênis é um fato não muito raro no Estado do Maranhão. Isso pode acontecer por diferentes motivos. Esta pesquisa tem como principal objetivo estudar as possíveis causas para o surgimento dessa doença, principalmente os aspectos relacionados com a presença do papilomavírus (conhecido como HPV) e alterações no DNA (material responsável por toda informação necessária para o bom funcionamento do corpo).

Como será feita esta pesquisa?

As pessoas serão convidadas a participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Os participantes serão atendidos pelo médico que fará algumas perguntas, examinará o paciente e, se necessário, poderá solicitar alguns exames complementares para auxiliar no diagnóstico.

Quais os riscos e limites que podem ser encontrados quando for feita a coleta de material biológico?

Os riscos são mínimos, pois a análise dos fragmentos de tumor não implicará em riscos adicionais na sua cirurgia e, nem tampouco, em aumento no tempo de operação ou extensão da mesma, ou terá qualquer influência no resultado do seu tratamento, de modo que você é livre para escolher entre participar ou não da pesquisa.

Todos os dados do paciente são absolutamente confidenciais e, portanto, serão comunicados somente à pessoa ou responsável e ao profissional médico que acompanha o paciente.

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração financeira, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar no entendimento do estabelecimento da doença e poderá contribuir para a melhoria do diagnóstico e tratamento dessa patologia.

Os pacientes terão acompanhamento e assistência médica no hospital onde realizam tratamento médico, mesmo que não participem desta pesquisa ou que a pesquisa seja interrompida.

O que vai ser feito com o material e os dados coletados de cada paciente?

Rotineiramente, o material biológico retirado é destinado para exames clínicos laboratoriais necessários para um diagnóstico. O restante do material retirado é armazenado e pode ser usado para novos exames, caso seja necessário. Caso contrário, é descartado, conforme regulamenta a legislação sanitária no Brasil.

Neste estudo, estamos solicitando sua permissão para utilizar o resto de tecidos e/ou fluídos retirados de você que não são mais necessários para o seu diagnóstico. As amostras serão registradas por números, para evitar identificação dos pacientes.

A eventual inclusão dos resultados da pesquisa em publicação científica será sempre feita de modo a manter seu anonimato.

O paciente ou seu responsável legal poderá escolher entre ser informado ou não dos resultados da pesquisa. Aqueles que se interessarem em saber sobre os resultados obtidos com o presente estudo serão orientados pela coordenadora geral do Projeto, Dra. Silma Regina Ferreira Pereira (professora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão), podendo ser contactada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, no endereço: Av. dos Portugueses, 1966, cidade universitária do Campus do Bacanga, São Luís, Maranhão, telefone 32728543.

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA está situado na Avenida dos Portugueses número 1966, Cidade Universitária do Bacanga, Prédio do CEB Velho, PPPG, Bloco C Sala 07. E-mail cepufma@ufma.br, telefone (98)3272-8708. Este comitê tem, como uma de suas atribuições, garantir a manutenção dos aspectos éticos da pesquisa, bem como a obtenção do consentimento livre e esclarecido dos indivíduos ou grupos para a sua participação.

Os pacientes que não concordarem em participar da pesquisa não terão nenhum prejuízo sobre seu tratamento.

Declaro que fui devidamente esclarecido sobre a pesquisa da qual estou sendo convidado a participar, e que CONCORDO, voluntariamente, em participar do referido trabalho.

São Luís, _____ de _____ de 20____

NOME POR EXTENSO/RG

Assinatura

Anexo 2: Parecer Consustanciado do Comitê de Ética e Pesquisa



PARECER CONSUSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS E NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA EM CÂNCER PENIANO

Pesquisador: SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46371515.5.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.308.275

Apresentação do Projeto:

O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos. No entanto, sua incidência é mais elevada em países em desenvolvimento, como o Brasil, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) esse tipo de tumor representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem, tendo sido registrados 363 mortes no ano de 2010. De acordo com a SBU, em 2007, o Maranhão teve 10,7% dos casos de câncer de pênis notificados no Brasil, estando entre os cinco estados onde há maior prevalência, sendo superior até mesmo que o câncer de próstata. No entanto, faz-se necessário a realização de um estudo epidemiológico mais robusto e atualizado para que seja conhecida a realidade sobre a ocorrência dessa patologia no Estado. A etiologia é heterogênea, mas estudos mostram uma relação com baixas

condições socioeconômicas e de instrução, à má higiene íntima e a homens que não se submeteram à circuncisão. Apesar da alta prevalência de câncer peniano no Brasil, dados epidemiológicos, análise do background genético, parâmetros clínicos, evolução da doença e resposta aos tratamentos, ainda são incipientes, o que dificulta o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença e, consequentemente, resulta nos altos índices

de diagnóstico em estágios avançados e mortalidade. A caracterização de alterações genômicas e

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética
UF: MA
Município: SAO LUIS
CEP: 65.080-040
Telefone: (98)3272-8708
Fax: (98)3272-8708
E-mail: cepufma@ufma.br

Página 01 de 05



Continuação do Parecer: 1.308.275

de expressão gênica apresenta grande potencial para a identificação de marcadores moleculares e vêm contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias em uma série de cânceres humanos. Neste sentido, propomos, por meio de análises de array-CGH, alteração no número de cópias (CNA), miRNAs, e análise de expressão gênica e proteica, a identificação de marcadores moleculares em tumores penianos de pacientes provenientes do Estado do Maranhão, normalmente diagnosticados em estágios clínicos avançados, onde o risco de recorrência tumoral é elevado. Os perfis genômicos observados serão validados através de análises genéticas específicas e funcionais, incluindo as principais vias de sinalização celular identificadas. Estas análises podem, futuramente, contribuir para a redução da taxa de mortalidade por estes tumores, pela predição do prognóstico em uma fase inicial do atendimento clínico, bem como pela escolha adequada do tratamento, propiciando uma resposta terapêutica satisfatória.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar alterações genômicas e na expressão gênica e proteica em câncer de pênis, buscando a identificação de marcadores moleculares para este tipo de tumor.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar os portadores de carcinomas penianos do Estado do Maranhão para o desenvolvimento de um registro epidemiológico específico para os homens do estado, a fim de identificar os principais fatores de risco e promover e incentivar ações preventivas.
- Identificar a presença de papilomavírus humano (HPV) e genotipar os subtipos virais.
- Identificar o perfil de alterações genômicas através do método de array-CGH.
- Identificar o perfil de expressão de miRNAs.
- Identificar alterações no número de cópias gênicas (CNA) por meio de qPCR.
- Integrar os dados de alterações de número de cópias de DNA com os de expressão de miRNA nas mesmas amostras tumorais.
- Avaliar alterações na expressão de genes específicos por meio de RT-PCR.
- Identificar, por citometria de fluxo e imunohistoquímica, variações na expressão de proteínas relacionadas às alterações genéticas detectadas nas células tumorais.
- Correlacionar as alterações observadas com parâmetros clínico-patológicos dos pacientes (tipo histológico, grau de estadiamento, tamanho do tumor), incluindo dados de seguimento clínico (tempo livre da doença, recorrência tumoral, sobrevida, entre outros).

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética
UF: MA
Município: SAO LUIS
CEP: 65.080-040
Telefone: (98)3272-8708
Fax: (98)3272-8708
E-mail: cepufma@ufma.br

Página 02 de 05

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está muito bem elaborada com um forte referencial teórico bons objetivos excelentes materiais e métodos, e demais elementos necessários ao bom andamento do projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas ou esclarecidas e corrigidas pela pesquisadora e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB - INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_246615.pdf	29/10/2015 15:48:44		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALIME.pdf	29/10/2015 15:46:25	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAGYLEANES.pdf	29/10/2015 15:46:04	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALABGEM.pdf	29/10/2015 12:37:35	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALabimunofisiologia.pdf	29/10/2015 12:31:36	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAAnaPaula.pdf	29/10/2015 12:29:12	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaMartaBelfort.pdf	29/10/2015 12:23:47	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTALEUDIVAN.pdf	29/10/2015 12:23:15	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Outros	RESPOSTAOPARECERcapeniano.pdf	28/10/2015 19:20:31	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Outros	FichaSujeitodapesquisa.pdf	28/10/2015 18:57:15	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e	Anuenciainstituicao.pdf	28/10/2015 18:56:25	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Este projeto confere riscos mínimos aos pacientes uma vez não será realizada nenhuma intervenção direta ou indireta para fins exclusivos desta pesquisa, mas somente aquelas previstas para o diagnóstico e tratamento dos sujeitos da pesquisa. As amostras biológicas a serem utilizadas serão provenientes de procedimentos cirúrgicos prescritos para os casos com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pâncreas. A coleta dos fragmentos de tumor não implicará em riscos adicionais no tratamento ou na cirurgia, e nem tampouco, em aumento no tempo de operação ou extensão da mesma. Sob o aspecto emocional, os pacientes serão informados pela equipe médica, que sua participação na pesquisa não terá nenhuma influência sobre seu tratamento, de modo que eles devem se sentir livres para escolher entre participar ou não da pesquisa. Assim, é garantida a continuidade do acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação dos pacientes independentemente destes concordarem ou não em participar da pesquisa. É garantida a manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa. Todos os dados da paciente são absolutamente confidenciais e, portanto, serão comunicados somente à paciente ou ao médico que a acompanha. As amostras biológicas, bem como as informações clínico-laboratoriais serão codificadas para registro em programa computacional específico, cuja acesso somente é possível através de senha de identificação única. Os resultados das análises genéticas para fins de divulgação científica sempre serão feitos considerando-se o grupo amostral, e não individualmente. Esses procedimentos garantem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de auto estima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros, conforme previsto na resolução nº466, de 12 de dezembro de 2012.

Benefícios:

O material biológico será processado para análise de alterações moleculares e este trabalho deverá produzir resultados que não beneficiarão diretamente o sujeito da pesquisa, mas contribuirá para produção de conhecimento sobre a patologia para futuras investigações sobre possíveis marcadores genéticos moleculares diagnósticos e prognósticos. Os resultados obtidos nesta pesquisa serão comparados aos já existentes na literatura científica e serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Banco de Dados CaPe -2017-2021

1	Identificação	Dados clínicos										HPV
		Doença	Localização	Forma	Tratamento	Substância	Tipos de HPV	Idade	Sexo	Estado	Localização	HPV
2	1403	Quercia	Esclerose	Forma	Tratamento	Substância	Tipos de HPV	Idade	Sexo	Estado	Localização	HPV
3	971	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
4	972	Aguturorol	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
5	973	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
6	974	opuntia	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
7	975	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
8	976	opuntia	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
9	977	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
10	978	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
11	979	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
12	980	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
13	981	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
14	982	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
15	983	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
16	984	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
17	985	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
18	986	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
19	987	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
20	988	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
21	989	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
22	990	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
23	991	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
24	992	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
25	993	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
26	994	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
27	995	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
28	996	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
29	997	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
30	998	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
31	999	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
32	1000	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
33	1001	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
34	1002	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
35	1003	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
36	1004	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
37	1005	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
38	1006	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
39	1007	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
40	1008	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
41	1009	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
42	1010	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
43	1011	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
44	1012	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
45	1013	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
46	1014	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
47	1015	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
48	1016	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
49	1017	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
50	1018	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
51	1019	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
52	1020	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
53	1021	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
54	1022	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
55	1023	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
56	1024	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
57	1025	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
58	1026	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
59	1027	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
60	1028	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
61	1029	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
62	1030	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
63	1031	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
64	1032	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
65	1033	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
66	1034	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
67	1035	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
68	1036	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
69	1037	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
70	1038	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
71	1039	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
72	1040	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
73	1041	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
74	1042	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
75	1043	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
76	1044	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
77	1045	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
78	1046	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
79	1047	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
80	1048	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
81	1049	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
82	1050	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
83	1051	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
84	1052	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
85	1053	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
86	1054	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
87	1055	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
88	1056	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
89	1057	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
90	1058	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
91	1059	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
92	1060	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
93	1061	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
94	1062	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
95	1063	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
96	1064	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
97	1065	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
98	1066	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
99	1067	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...
100	1068	Levedor	neblina	rim	...	...	...	...	...	...	...	...