

Estudo da Técnica de Imunoistoquímica para Avaliação da Microvascularização causada pelo Papilomavírus Humano (HPV) em Câncer de Pênis

Study of Immunohistochemistry Technique for Assessing Microvascularization

caused by Human Papillomavirus (HPV) in Penile Cancer

Estudio de la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la microvascularización

causada por el virus del papiloma humano (VPH) en el cáncer de pene

Rafael de Lima **SANTOS**

Discente da Graduação em Medicina do

Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino, 13870-377 São João da Boa Vista- SP, Brasil

Docente do Curso de Pós-graduação em Estética Centro Universitário UniMetrocamp – Wyden, 13035-500 Campinas – SP, Brasil

Biomédico pelo Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, 13990-000 Espírito Santo do Pinhal – SP, Brasil

Especialista em Biomedicina Estética pela Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, 04110-001 São Paulo – SP, Brasil

<https://orcid.org/0009-0000-1725-9746>

Wellington Aparecido Farina de **AMORIM**

Discente da Graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário UniMetrocamp – Wyden, 13035-500, Campinas – SP, Brasil

<https://orcid.org/0009-0009-8808-5208>

Raiane Cardanha de **LIMA**

Discente da Graduação em Medicina, Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino, 13870-377 São João da Boa Vista- SP, Brasil

<https://orcid.org/0009-0004-0676-2740>

Lucas Cardanha de **LIMA**

Discente da Graduação em Medicina, Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino, 13870-377 São João da Boa Vista- SP, Brasil

<https://orcid.org/0009-0007-9171-009X>

Silas Antonio Juvencio de **FREITAS FILHO**

Graduado em Odontologia pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) 38408-100 Uberlândia – MG, Brasil;

Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas pela UFU, 38408-100 Uberlândia –MG, Brasil;

Doutor em Ciências com ênfase em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru (USP) 17012-901 Bauru – SP, Brasil;

Docente do Curso de Medicina e Coordenador do Curso de Odontologia do Centro Universitário das Faculdades Associadas de

Ensino (UNIFAE) 13870-377 São João da Boa Vista- SP, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-6478-7477>

Danyelle Cristine **MARINI**

Doutora em Educação pela Universidade Metodista de Piracicaba, 13400-390 Piracicaba- SP, Brasil

Docente do Curso de Medicina do Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino (UNIFAE), 13870-377 São João da Boa Vista- SP, Brasil

<https://orcid.org/0000-0003-0700-7603>

Resumo

O carcinoma de pênis (CaPe) incide predominantemente em regiões menos desenvolvidas do globo. Seus fatores de risco incluem má higiene genital, fimose e infecção por HPV (Papillomavirus Humano). A ativação angiogênica é essencial à sobrevivência das células neoplásicas, porém não há dados desse processo em CaPe. O presente estudo tem como objetivo revisar e correlacionar a infecção pelo HPV com o processo angiogênico em CaPe. Foram analisados 66 artigos com diagnóstico de carcinoma de células escamosas de pênis, diagnosticados entre 1994 à 2017, com presença de HPV. Foi feita a revisão dos marcadores CD34, CD31 e CD105 e de fatores pró-angiogênicos (VEGF, VEGFR1 e VEGFR2). Apenas a neoangiogênese, marcada pelo CD105, esteve mais pronunciada em casos associados ao HPV de alto risco. Isto aponta para um mecanismo adjuvante da neoangiogênese promovida ou facilitada por esse vírus. Além disto, demais marcadores como VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 não apresentaram significância nos artigos analisados, assim como não houve unanimidade referente a utilização do p16INK4a para marcador de HPV.

Descritores: Moduladores da Angiogênese; Biomarcadores; Prevenção de Doenças.

Abstract

Penile carcinoma (PeCa) predominantly affects less developed regions of the world. Its risk factors include poor genital hygiene, phimosis, and HPV (Human Papillomavirus) infection. Angiogenic activation is essential for the survival of neoplastic cells; however, there is limited data on this process in PeCa. The present study aims to review and correlate HPV infection with the angiogenic process in PeCa. A total of 66 articles were analyzed, all with a diagnosis of squamous cell carcinoma of the penis, diagnosed between 1994 and 2017, and associated with HPV infection. The review included the markers CD34, CD31, and CD105, as well as pro-angiogenic factors (VEGF, VEGFR1, and VEGFR2). Only neoangiogenesis, marked by CD105, was more pronounced in cases associated with high-risk HPV. This suggests an adjunct mechanism of neoangiogenesis promoted or facilitated by this virus. Additionally, other markers such as VEGF, VEGFR1, and VEGFR2 showed no significance in the analyzed articles, and there was no consensus regarding the use of p16INK4a as an HPV marker.

Descriptors: Angiogenesis Modulating Agents; Biomarkers; Disease Prevention.

Resumen

El carcinoma de pene (CaPe) ocurre predominantemente en regiones menos desarrolladas del mundo. Entre sus factores de riesgo se encuentran la mala higiene genital, la fimosis y la infección por VPH (virus del papiloma humano). La activación angiogénica es esencial para la supervivencia de las células neoplásicas, pero no hay datos sobre este proceso en el CaPe. El presente estudio tiene como objetivo revisar y correlacionar la infección por VPH con el proceso angiogénico en el CaPe. Se analizaron 66 artículos con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pene, diagnosticados entre 1994 y 2017, con presencia de VPH. Se revisaron los marcadores CD34, CD31 y CD105 y los factores proangiogénicos (VEGF, VEGFR1 y VEGFR2). Sólo la neoangiogénesis, marcada por CD105, fue más pronunciada en los casos asociados con el VPH de alto riesgo. Esto apunta a un mecanismo adyuvante de neoangiogénesis promovido o facilitado por este virus. Además, otros marcadores como VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 no fueron significativos en los artículos analizados, y no hubo unanimidad respecto al uso de p16INK4a como marcador de VPH.

Descriptores: Moduladores de la Angiogénesis; Biomarcadores; Prevención de Enfermedades.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de pênis (CaPe) representa um importante problema da saúde, especialmente

em regiões menos desenvolvidas do globo. Sua incidência varia entre os países, indo de alta (2-4/100.000 hab.) na África, Ásia e América do Sul

(especialmente Brasil e Paraguai) a baixa (0,3-1/100.000 hab.) na China, América do Norte, Europa central, Japão e alguns países da América do Sul, como Chile. Apresenta incidência considerada intermediária (1-2/100.000 hab.) em países como Portugal, Itália, Índia, Tailândia, Austrália, Colômbia, Peru e Argentina¹.

Portanto, não é regra que todos os países de um mesmo continente com situação socioeconômica similar sejam atingidos da mesma forma por esta doença. Na América do Sul há variação de baixa incidência (Chile, com 0,7/100.000 hab.), até muito alta (Paraguai, com 4,2/100.000 hab.). Na África, o Zimbábue apresenta incidência baixa (0,9/100.000 hab.) em contraste com Uganda (2,8/100.000 hab.). No Brasil há diferença de incidência de acordo com a região analisada, variando de 5,7% no Nordeste, 5,3% no Norte, 3,8% no Centro-Oeste, 1,4% no Sudeste e 1,2% no Sul¹.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA)² o câncer de pênis atinge aproximadamente 1,3 em cada 100 mil habitantes. Embora não seja uma doença de alta incidência, seu comportamento é bastante agressivo. Entre 2007 e 2022, foram feitas 7.790 amputações do pênis pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em função desse tipo de câncer, o que equivale a uma média de 486 cirurgias por ano. Este tipo de neoplasia não se enquadra no grupo dos grandes problemas de saúde pública do Brasil, embora seja importante, pois registra-se números baixos quando comparados às neoplasias de alta incidência, como a de próstata e pulmão. Porém, quando diagnosticada, é de extrema importância, por afetar intensamente a área psicossocial do paciente.

Relatos da incidência deste tipo de tumor podem ser observados em homens de 50 a 70 anos. Entretanto, no Brasil, estudos indicam casos em homens mais jovens, com idades inferiores a 35 anos. O CaPe é uma doença loco regional, e a sua sobrevivência em 5 anos cai dramaticamente em pacientes com metástases linfonodais. Este tumor pode acarretar grande morbidade, tanto pela doença em si, quanto pelo tratamento, que pode incluir a amputação parcial ou total do órgão. Embora seja uma doença de diagnóstico relativamente fácil, os pacientes continuam procurando atendimento médico em estádios avançados, com linfonodos comprometidos e, portanto, com prognóstico desfavorável. A taxa de mortalidade mundial relacionada a esta neoplasia varia de 26,7 a 41%³.

Os fatores de risco para o câncer de pênis (CaPe) incluem má higiene genital, HIV, fimose, tabagismo, práticas sexuais de risco, como sexo com animais, lesões epiteliais precursoras e infecção pelo papilomavírus humano (HPV)^{4,5}. A patogênese do CaPe ocorre por duas principais

vias, uma relacionada e outra não relacionada ao HPV. A associação do vírus, especialmente os tipos 16 e 18, com o CaPe varia entre 10% e 80%, o que pode ser atribuído à diferença na sensibilidade dos testes de detecção⁶.

O esmegma é composto por células epiteliais esfoliadas, óleos, gorduras e produtos da bactéria *Mycobacterium smegmatis*, podendo se acumular no prepúcio. Sua produção é mais intensa entre os 20 e 40 anos. Segundo Guimarães et al.⁷ a associação entre esmegma e o câncer de pênis é fraca e provavelmente se deve à inflamação crônica causada por antígenos exógenos na mucosa. A circuncisão, praticada por motivos religiosos entre alguns grupos, como os judeus, é um fator protetor. Em crianças circuncidadas ao nascimento, a incidência de câncer de pênis é nula, enquanto a realização entre 3 e 12 anos aumenta a incidência para 0,15%, comparada a 3,1% nos homens não circuncidados. A circuncisão facilita a exposição da glândula e melhora a higiene, fatores que mostram forte relação com a proteção contra o câncer de pênis⁷.

Apesar de uma associação com o fumo ter sido observada repetidamente, o papel exato que este fator desempenha no desenvolvimento desta doença permanece desconhecida. Existe uma associação entre homens que fumavam quando foram diagnosticados com CaPe, tanto *in situ* quanto invasivo, em uma revisão feita por Guimarães et al.⁷. Foi encontrada uma relação dose-resposta, entre os fumantes que consumiam 10 ou mais cigarros ao dia, com risco significativamente maior do que os fumantes leves. O risco de CaPe entre os homens que fumavam no momento do diagnóstico foi de 2,8 vezes maior do que os homens que nunca fumaram.

No Brasil, indivíduos infectados pelo HPV apresentam uma chance de 30% de desenvolver câncer de pênis, sendo que um estudo de Guimarães et al.⁶ revelou uma incidência de 75% de HPV em pacientes com tumores invasivos. Outro fator importante é a infecção pelo HIV, embora o mecanismo exato pelo qual a imunossupressão causada por esse vírus aumenta o risco de câncer de pênis associado ao HPV ainda não seja completamente compreendido. Entre os infectados pelo HIV, a incidência de câncer de pênis invasivo relacionado ao HPV não parece estar diretamente ligada à contagem de células TCD4+, que mede a resposta imunológica. A maior sobrevivência de pessoas com HIV, aliada à imunossupressão, contribui para o aumento da incidência desse tipo de câncer⁷.

O líquen escleroso (LS) é uma doença inflamatória crônica que pode causar fimose e estenose do meato uretral, com lesões iniciais poligonais e brancas que evoluem para placas atróficas. Afeta principalmente a glândula e o

prepúcio, mas pode envolver outras áreas, como o freio e a uretra. É mais comum em homens não circuncidados, com média de idade de 54 anos. A causa exata do LS é desconhecida, mas pode estar relacionada a fatores autoimunes, infecções, traumas e fatores hormonais. A relação entre LS e câncer de pênis (CaPe) é controversa. Em 51% dos casos de neoplasia intraepitelial peniana bem diferenciada, houve associação com LS, mas não com tipos de PeIN pouco diferenciados. A eritroplasia de Queyrat e a doença de Bowen, antes vistas como pré-malignas, são, na verdade, lesões malignas não invasivas. O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus que possui como material genético o DNA dupla fita e que, ao infectar as células basais do epitélio por meio de micro abrasões no tecido, desregula o ciclo celular. Este processo ocorre através da interação entre os oncogenes virais E6 e E7 com as proteínas regulatórias p53 e pRb, desregulando o controle de diferenciação celular do homem⁸.

Uma vez nas células da camada basal, a expressão gênica viral é firmemente reprimida, apesar da expressão limitada de proteínas dos genes “early” (E5, E6 e E7), o que resulta em um aumento da proliferação celular e expansão lateral. A proteína viral E5 parece ter importância nas fases iniciais do curso da infecção e as proteínas E6 e E7 interagindo com p53 e RB, respectivamente, bloqueando a atividade supressora de tumor destes genes e de suas proteínas. Após a entrada do vírus nas camadas supra basais, genes virais “late” começam a ser expressos e o genoma circular do vírus é replicado e proteínas estruturais se formam. Nas camadas superiores do epitélio, partículas virais são então montadas e liberadas para infecção de outras células⁹.

Dentre os mais de 100 tipos de HPV já identificados, destacam-se os mais frequentemente encontrados na casuística. Estes tipos estão descritos no Tabela 1. A classificação em “alto risco, intermediário e baixo risco” seguiu critério proposto por Zur Hausen em 2002⁸.

Tabela 1 - Classificação dos tipos de Papilomavírus Humano (HPV), de acordo com o risco de associação a carcinomas

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

Fonte: Zur Hausen, 2002

A associação entre o vírus HPV e o câncer de colo de útero começou em 1949, com George Papanicolau, que introduziu uma técnica para identificar lesões pré-malignas. Nos anos 1970, Harold Zur Hausen comprovou o papel do HPV no desenvolvimento do câncer, e na década de 1990, a biologia molecular confirmou a presença do DNA viral em quase 100% dos carcinomas invasivos¹⁰. O HPV também é um fator de risco para cerca de

25% dos casos de câncer orofaríngeo, especialmente amigdalino, influenciando o prognóstico e a resposta ao tratamento. Há evidências preliminares de que o HPV de alto risco pode estar envolvido na carcinogênese laríngea, embora mais estudos sejam necessários¹¹. Além disso, em 66 a 100% das neoplasias intraepiteliais vulvares do tipo usual, o genoma do HPV é detectável, especialmente o HPV16, com uma alta incidência de multifocalidade. As lesões apresentam agrupamento de células neoplásicas intraepiteliais com alterações nucleares sutis e mitoses limitadas às camadas basal e parabasal¹¹.

O HPV é transmitido principalmente por contato sexual, incluindo oral-genital, genital-genital ou manual-genital, sendo crucial educar a população sobre a prevenção e os comportamentos de risco. Não há evidências de que o vírus seja transmitido por meio de objetos ou compartilhamento de roupas e toalhas, tornando a detecção precoce vital para identificar a infecção antes do surgimento de sintomas clínicos^{12,13}.

A prevenção primária do câncer de colo do útero está ligada à redução do risco de contágio pelo HPV, que é transmitido sexualmente, presumivelmente por microabrasões na mucosa ou pele anogenital. O uso de preservativos oferece proteção parcial, pois o contato com áreas como vulva e escroto também pode transmitir o vírus. Exames ginecológicos regulares e o uso de preservativos são medidas importantes na prevenção¹³.

A vacinação contra o HPV é uma medida preventiva primária, mas não substitui o uso de preservativos, já que outras DSTs podem ser transmitidas sexualmente. A vacina não protege contra todos os subtipos oncogênicos de HPV, sendo recomendada a vacinação entre 9 e 13 anos, antes do início da vida sexual, quando os níveis de anticorpos gerados são mais elevados do que os obtidos naturalmente¹⁴.

O Ministério da Saúde adotou a vacina quadrivalente contra os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18, que oferece proteção contra vírus de baixo e alto risco. Essa vacina é preventiva e não tem eficácia contra infecções pré-existentes ou doenças clínicas estabelecidas, sendo inicialmente destinada a mulheres, mas agora também disponível para homens entre 9 e 26 anos^{13,14}.

A vacinação contra o HPV não substitui o exame de Papanicolau, que deve ser realizado regularmente pelas mulheres, mesmo após completar o esquema de imunização. Estudos demonstraram que a inclusão de homens na vacinação pode ampliar a proteção contra o vírus, sendo aprovada pelo FDA para homens de 9 a 26 anos que não tiveram contato com os tipos virais envolvidos na vacina¹⁴.

O objetivo deste estudo é compreender a interação entre o câncer de pênis e a neovascularização associada à infecção pelo papilomavírus humano (HPV), revisando bibliograficamente os principais marcadores de angiogênese. Além disso, busca-se relacionar os marcadores de indução angiogênica e seus receptores, como VEGF, VEGFR1 e VEGFR2, ao fator de risco representado pelo HPV. A pesquisa também visa verificar se há diferenças na área vascular peniana, identificada por marcadores como CD31, CD34 e CD105, e sua correlação com a infecção por HPV. Outro objetivo relevante é identificar se existe uma relação direta entre a expressão da proteína p16INK4a e a presença do HPV. Esta análise é justificada pela importância de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na progressão do câncer de pênis, especialmente no contexto da infecção viral, para melhor compreensão e potencial desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

MATERIAL E MÉTODO

Para esse estudo foi realizado uma pesquisa qualitativa, descritiva e transversal do tipo revisão bibliográfica, com materiais selecionados conforme publicações nos bancos de dados das bases: LILACS, Scientific Electronic Library Online (SCIELO), PubMed e Medline. Foram analisados os artigos científicos e sites de institutos de pesquisa relacionados ao câncer de pênis, HPV e a reação padrão para visualização dos marcadores tumorais através de imunistoquímica. Em seguida, foram utilizados critérios para selecionar os artigos e sites, sendo escolhidos aqueles que estavam disponíveis na íntegra na língua portuguesa ou inglesa e que estivessem relacionados com o tema abordado, no período compreendido entre os anos de 1994 a 2024. Os critérios de exclusão foram todos os trabalhos que não se enquadravam nos critérios de inclusão ou que não se relacionavam ao tema abordado e que estavam publicados antes do ano de 1994.

REVISÃO DA LITERATURA

A angiogênese é um processo fundamental e complexo em que ocorre formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sendo essencial em condições fisiológicas como ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, embriogênese, crescimento tecidual, desenvolvimento mamário na lactação, resposta imune, inflamação e cicatrização. No adulto saudável, o *turnover* vascular é extremamente baixo e a angiogênese raramente ocorre. A angiogênese é essencial à sobrevivência de tumores¹⁵.

Apesar das anormalidades genéticas que promovem o crescimento tumoral, a sobrevivência das células neoplásicas agrupadas em formações

sólidas não seria possível a partir do tamanho de 1mm³ sem a ativação angiogênica. Essa exigua medida representa a distância máxima em que o oxigênio e os nutrientes podem ser oferecidos por simples difusão dos tecidos, dispensando a irrigação de vasos sanguíneos próprios. Além desse tamanho, na ausência da vascularização neoformada, o tumor deixa de aumentar e ocorre morte celular induzida por hipóxia e pela formação do óxido nítrico. Essa transição é conhecida como "ativação angiogênica". Quando o tumor ultrapassa essa fase, novos vasos são formados continuamente. A hipóxia em áreas necróticas do tumor é um estímulo permanente para o crescimento da vascularização¹⁶.

A maior parte dos carcinomas inicia seu desenvolvimento a partir de pequenos nódulos avasculares equilibrados entre a proliferação e apoptose até iniciarem a ativação angiogênica. O déficit na tensão tecidual de oxigênio e a consequente liberação de óxido nítrico suscitam a ativação de genes para a transcrição do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*)¹⁶.

Dvorak¹⁷ sugeriu que o VEGF é o fator responsável pela formação de fenestrações entre as células endoteliais. Demonstraram que a partir da administração tópica de VEGF ocorre o surgimento de fenestrações no endotélio de pequenas vênulas e capilares, mesmo em regiões nas quais normalmente o endotélio não apresenta tais fenestrações. A produção de VEGF e demais fatores pró-angiogênicos pelas células tumorais influenciam a vascularização normal do hospedeiro e é essencial à sobrevivência do tumor. Inicia-se a partir da vasodilatação induzida pelo óxido nítrico em situações de baixa tensão de oxigênio. Frente à queda da tensão tecidual do oxigênio, o mRNA-VEGF é ativado para a transcrição de mediadores VEGF e HIF's (do inglês *hypoxia induced factors*, fatores de transcrição induzidos por hipóxia). Por ação do HIF inicia-se a síntese do VEGF, entre outras proteínas igualmente capazes de estimular as células endoteliais. Sob o estímulo do VEGF formam-se fenestrações na rede capilar e a permeabilidade vascular aumenta.

A ativação dos receptores tirosina-quinase é tipicamente iniciada pela ligação da molécula ativadora (por exemplo, hormônio ou fator de crescimento) no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação induz uma dimerização dos receptores, resultando na autofosforilação dos resíduos tirosina dentro do domínio citoplasmático, onde o primeiro substrato deste domínio vem a ser o próprio receptor. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o VEGF promove a angiogênese não foram ainda desvendados. A ligação do VEGF aos seus diferentes receptores inicia diferentes vias de

sinalização intracelular. Esta ligação leva à dimerização do receptor, uma autofosforilação de resíduos tirosina que conduzem à ativação da transdução de sinal de moléculas como fosfolipase Cy, levando à liberação de cálcio (Ca^{2+}) e ativação da proteína quinase C. Esta, por sua vez, estimula as vias Raf/MAPK/quinase que aumentam a proliferação celular. A mobilização de Ca^{2+} e a ativação do complexo Raf/MAPK/quinase são a chave da sinalização da permeabilidade vascular induzida pelo VEGF por meio da ativação da atividade endotelial da síntese do óxido nítrico¹⁸.

O controle da angiogênese é feito por meio da permeabilidade vascular que aumenta em resposta ao VEGF, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas que caminham entre as células endoteliais recém-migradas. As junções são formadas por meio de interações homofílicas entre as caderinas endotelial vascular, com estabilização intracelular do citoesqueleto de actina via interação β -catenina e α -catenina. Receptores tirosino-quinase podem induzir a fosforilação em tirosina da β -catenina e seus correlatos, levando ao aumento da migração celular e alteração da permeabilidade vascular¹⁹.

Como tratou-se de avaliação de vasos sanguíneos os autores optaram por manter cortes inteiros nas lâminas com aproximadamente 4 micrômetros de espessura e colocados em lâminas específicas (com carga elétrica) para a realização da técnica. Como o tecido encontra-se em parafina, é necessário que efetue o processo de desparafinização, seguindo protocolos definidos por cada autor. O Quadro 1 mostra as especificações mais utilizadas pelos autores na escolha dos anticorpos.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para a reação de imunistoquímica

Proteína	Clone	Fabricante	Padrão de marcação
CD34	QBEnd10	DAKO, Carpinteria, CA, USA	Citoplasma
CD31	JC70A	DAKO, Carpinteria, CA, USA	Citoplasma
CD105	SN6h	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	Citoplasma
VEGF	VF1	DAKO, Carpinteria, CA, USA	Citoplasma
VEGFR1 e 2	Policlonal	Neomarkers, Fremont, Califórnia, USA	Citoplasma
P16	16P07	Neomarkers, Fremont, Califórnia, USA	citoplasma e núcleo

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o Fator de Crescimento Placentário (PlGF, do inglês *placental growth factor*), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F. O VEGF-A é uma citocina potente e multifuncional que exerce seu efeito no endotélio¹⁵.

O gene humano do VEGF-A está organizado em oito éxons, separados por sete íntrons e localizado no cromossomo 6p21.3. O

splicing alternativo resulta em quatro isoformas principais, contendo 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Embora com menor frequência, outras variantes também têm sido relatadas, incluindo VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₆₂ e VEGF_{165b}. Paradoxalmente, esta última variante teria um efeito inibitório na mitogênese induzida pelo VEGF¹⁵.

Descrita tanto em processos fisiológicos, quanto em condições patológicas, é elucidada em duas situações principais: em tecidos que sofrem renovação ou modificações cíclicas e em situações de inflamação e reparo tissular autolimitados. O início da nova vascularização ocorre por meio da formação de brotos capilares que geralmente são compostos por uma ou duas células. Estes brotos podem formar um lúmen por meio da canalização intracelular que ocorre por meio de vesículas citoplasmáticas ou por um processo alternativo de canalização intercelular. O VEGF₁₈₉ promove a diminuição do lúmen vascular, enquanto o VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅ promovem a sua formação e, conseqüentemente, crescimento vascular²⁰.

O VEGF induz a angiogênese, atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase. Eles são conhecidos como VEGFR-1 e VEGFR-2 e são expressos nas células do endotélio vascular (Figura 1). Estes receptores têm diferentes propriedades físicas, biológicas e possuem atividade tirosina quinase (TK). As proteínas tirosina quinase (PTK) são enzimas que catalisam a transferência do grupo fosfato da adenosina trifosfato (ATP) para resíduos tirosina de outras proteínas ou polipeptídeos^{21,22}.

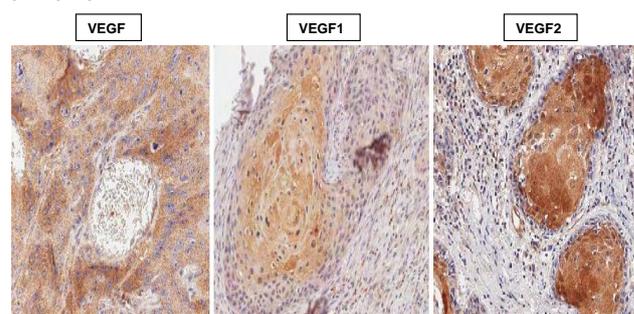


Figura 1. Padrão de expressão de anticorpo VEGF e seus receptores 1 e 2 (Fonte: Kalitin et al.²¹, Dellinger et al.²²).

O CD34 é uma glicoproteína e funciona como fator de adesão celular, localizada no cromossomo 1q32.2, atua mediando a ligação de células-tronco hematopoéticas à matriz extracelular ou às células do estroma. Utiliza-se a denominação CD34 também para identificar o gene que codifica tal proteína. O CD34 é expresso tanto em pequenos quanto em grandes vasos e a intensidade de marcação é igual tanto nos tecidos normais como nos neoplásicos¹⁸ (Figura 2A).

Localizada no cromossomo 17q23.3, o marcador CD31 considerado uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície de plaquetas, monócitos, granulócitos, linfócitos B e na junção intercelular endotelial. A molécula possui um domínio extracelular que medeia o contato e a adesão célula-célula endotelial, estabilizando a monocamada de células endoteliais²³ (Figura 2C).

O CD105 é considerado uma endoglina importante utilizada no estudo é a CD105, considerada glicoproteína de membrana endotelial homodimérica localizada no cromossomo 9q34.11, contém uma sequência peptídica para receptores de adesão da família das integrinas (Figura 2C). Este marcador é expresso em células endoteliais de capilares, arteríolas, vênulas e em diversos tecidos. A grande vantagem deste marcador em relação aos pan-endoteliais, está em reagir preferencialmente com vasos ativados ou em proliferação, ou seja, distinguindo estes da vasculatura pré-existente no tecido em estudo²⁴.

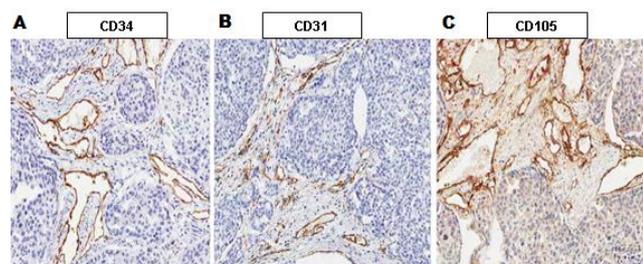


Figura 2. Padrão de expressão de marcadores de endotélio. A) CD34. B) CD31. C) CD105 (Fonte: Martins et al.¹⁸, He et al.²³, El-Gohary et al.²⁵).

Localizada no cromossomo 9p21.3, a p16, é um importante supressor de tumor e já bastante descrito em carcinomas. Ela atua inibindo a progressão do ciclo celular e por isso quando está ausente permite um aumento na fosforilação de pRb com subsequente liberação do fator de transcrição E2F. Este processo pode ocorrer por diminuição da expressão ou mesmo por mutações nesta proteína. A expressão de p16 está fortemente associada à infecção por HPV¹² (Figura 3).

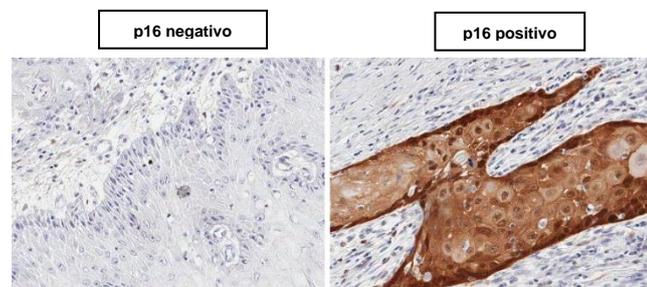


Figura 3. Marcador de expressão da proteína p16INK4a em tumor com presença de HPV (Fonte: Cubilla et al. 2007)

Em 1971, Folkman et al. difundiram o termo angiogênese para nomear o processo complexo em que são formados novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. Eles

isolaram um fator em tumores humano denominado *tumor angiogenesis factor* (TAF) que demonstrou atividade mitogênica às células endoteliais, estimulando a rápida formação de novos capilares. Estas observações propuseram que a angiogênese seria um pré-requisito para o crescimento neoplásico e não um efeito colateral deste. Assim surge a ideia de que o TAF seria um elemento produzido pelas células tumorais e que a sua inativação poderia ter grandes aplicações terapêuticas.

A expressão do fenótipo angiogênico, a partir de um subgrupo de células tumorais, demarca duas fases do desenvolvimento neoplásico: pré-vascular e vascular: a primeira fase, pré-vascular é caracterizada pelo diâmetro restrito do tumor (entre 2 a 3 mm) e limitação da população celular (< 10⁶ células). A população celular é mantida por difusão de O₂ e nutrientes através do espaço extracelular. A ausência de angiogênese impede a expansão do carcinoma *in situ* ou das micro metástases quiescentes, independente da capacidade de replicação celular, há um equilíbrio entre a proliferação e apoptose celular. Estas lesões são assintomáticas e clinicamente indetectáveis. A segunda fase, vascular caracteriza-se pela formação de novos vasos capilares e rápida proliferação celular neoplásica. O crescimento neoplásico requer novos capilares e a perfusão passa a ser o mecanismo de aporte de oxigênio, nutrientes e via de eliminação de metabólitos. A maioria dos tumores torna-se clinicamente detectável somente após a neovascularização. Durante a atividade angiogênica tumoral, um ou mais fatores pró-angiogênicos são liberados pelas células tumorais, difundindo-se através dos tecidos e, alcançando a rede vascular adjacente, desencadeando uma sequência de eventos²⁵. Fatores pró e antiangiogênicos são sumarizados no Quadro 2.

Quadro 2 - Fatores pró-angiogênicos e inibitórios da angiogênese

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

Fonte: Espinoza et al.²⁵

O processo de progressão tumoral da geração de uma célula neoplásica ao estabelecimento de metástases à distância, caracteriza-se por alterações cumulativas no

material genético das células em transformação, essas alterações são traduzidas, por exemplo, na perda do controle sobre a divisão celular, na imortalização e na aquisição da capacidade invasiva²⁵.

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e ao VEGF, degradação da membrana basal por metaloproteinases, perda das junções entre as células endoteliais pela ação do fator ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação, remodelamento e recrutamento de células periendothelias²⁶.

Estudos sobre a neovascularização utilizam parâmetros para quantificar esses novos vasos. A densidade microvascular (MVD), pode ser definida como um valor médio de contagem de vasos, obtido, por meio de uma metodologia historicamente pouco consensual, isto é, variável de estudo para estudo. Na maioria dos estudos, são contadas estruturas microvasculares intratumorais em áreas de maior concentração vascular ("hotspots"), fora de áreas escleróticas ou de necrose. Define-se como "microvaso", qualquer estrutura vascular, representada em secção transversal, longitudinal ou tangencial, que se apresente nitidamente separada de outras estruturas semelhantes. A área microvascular total (TVA) pode ser definida como a área ocupada por microvasos por unidade de área de tumor, obtida com a utilização de um microscópio dotado de objetiva (com aumento específico e diâmetro de campo conhecido), em um número limitado de campos (geralmente, 3 ou 4), subjetivamente selecionados em áreas de maior vascularização ("hotspots")²⁷.

Nos estudos iniciais de quantificação de angiogênese, a vasculatura era avaliada morfológicamente em cortes histológicos corados em H&E. Com o advento da imunoistoquímica, vários marcadores têm sido utilizados para revelar os microvasos. Dentre os marcadores mais comumente empregados, destacam-se: o CD34 e a molécula CD31/PECAM-1. Estes marcadores são chamados em conjunto de "pan-endoteliais". Em paralelo, outra classe de marcadores vasculares mais recentemente descrita é a dos marcadores de "endotélio ativado e/ou em proliferação", sendo o representante mais conhecido o CD105 (endoglina)²⁴.

Na forma patológica, os vasos neoformados são ramificados e distribuídos de maneira irregular com formação de "shunts" arteriovenosos sem padrão hierárquico. Além disso, seu funcionamento é bastante diferente dos neovasos presentes em fenômenos fisiológicos. Para que haja proliferação

celular e crescimento tissular é fundamental que as células envolvidas sejam capazes de realizar trocas com o seu microambiente, isto é, possam receber minimamente O₂, nutrientes e substâncias moduladoras e eliminar suas excretas²⁸.

A ligação entre a angiogênese e a proliferação tumoral está associada entre atividade proliferativa tumoral e aumento na densidade intratumoral de microvasos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar esta observação. Por exemplo, algumas mutações gênicas envolvidas no favorecimento da proliferação celular, como as mutações dos genes TP53, inclusive fazendo um paralelo com o HPV, uma vez que ele atua com bastante eficiência nesse gene e sua proteína, a p53 e *Hras*, também estão associadas à inibição de fatores antiangiogênicos (como a trombospondina-1, relacionada especificamente à mutação do p53) ou ao estímulo à produção de efetores pró-angiogênicos (como o VEGF, relacionado a mutações de ambos os genes mencionados). Tumores malignos geralmente se apresentam em condições de hipóxia, em decorrência do grande consumo de oxigênio relacionado à proliferação celular e do aumento de pressão tissular. Esta hipóxia, por sua vez, estimularia a produção de fatores pró-angiogênicos como o VEGF, o fator de crescimento fibroblástico básico e o fator de crescimento derivado de plaqueta. Ou seja, quanto maior o crescimento tumoral, maior a hipóxia e quanto maior a hipóxia, maior a proliferação vascular que, por sua vez, traz consigo a nutrição necessária para subsidiar mais crescimento tumoral. Para que o novo vaso seja formado e tenha funcionalidade primária será necessária adesão celular à respectiva membrana basal endotelial, sendo crucial neste processo a intervenção das moléculas de adesão, que se incluem em quatro famílias principais: Integrinas, Selectinas, Caderinas e a superfamília das Imunoglobulinas²⁸.

O tipo histológico mais frequente de CaPe, representando 95% dos tumores malignos de pênis, é o carcinoma de células escamosas ou espinocelular (CEC). Do ponto de vista de crescimento, pode ser dividido em dois grupos: forma exofítica (papilar) e endofítica (infiltrativo, ulceroso). A forma exofítica é bem diferenciada e fortemente queratinizada, podendo se transformar em uma grande massa polipóide. O CEC exofítico é geralmente localizado na glândula e pode ocorrer no prepúcio, já a forma endofítica é mais indiferenciada, ocorrendo no prepúcio, glândula e mais raramente na haste. Tumores ulcerados têm maiores taxas de metástase ganglionar. O carcinoma verrucoso é uma variante do CEC, de comportamento clínico menos agressivo²⁹.

De modo inverso à tendência infiltrativa e ulcerada do CEC, o carcinoma verrucoso constitui

uma lesão vegetante, de crescimento lento e com menor potencial de metastatização. Outras neoplasias mais raras incluem o carcinoma basocelular, sarcoma de Kaposi, melanoma e linfoma²⁹.

A graduação histológica mais comumente usada para o CEC é a de Broders. Este sistema baseia-se fundamentalmente no grau de queratinização, número de mitoses e no pleomorfismo nuclear. Quatro graus são identificáveis, sendo o grau I as lesões bem diferenciadas, e o grau IV os tumores indiferenciados. Geralmente a graduação histológica correlaciona-se com a profundidade do tumor, bem como com o risco de metástase inguinal. Guimarães et al.³⁰ encontraram associação entre lesões de alto grau, maior risco de comprometimento de linfonodos inguinais e maior risco de óbito pela doença. Dentro do grupo de células escamosas, existe uma divisão em subtipos (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação histopatológica dos carcinomas penianos

USUAL	
Frequência	48-65%
Principais características	Mais comum, similar a outros carcinomas epidérmóides em outros tecidos
Taxa de metástase	28-39%
Prognóstico	Intermediário
BASALÓIDE	
Frequência	4-10%
Principais características	Tumor agressivo associado ao HPV, composto de ninhos de tumores profundamente invasivos de células basalóides
Taxa de metástase	50-100%
Prognóstico	Desfavorável
VERRUCOSO	
Frequência	3-8%
Principais características	Tumor de baixo grau, geralmente invadindo apenas a superfície
Taxa de metástase	Nulo
Prognóstico	Excelente
WARTY	
Frequência	7-10%
Principais características	Similar ao verrucoso
Taxa de metástase	17-18%
Prognóstico	Bom
PAPILAR	
Frequência	5-15%
Principais características	Baixo grau, geralmente invade tecidos eréteis
Taxa de metástase	12%
Prognóstico	Bom
SARCOMATÓIDE	
Frequência	1-3%
Principais características	Profundamente invasivo e agressivo, semelhante ao fibrossarcoma, com necrose frequente
Taxa de metástase	75-89%
Prognóstico	Desfavorável
CUNICULATUM	
Frequência	<1%
Principais características	Profundamente infiltrativo
Taxa de metástase	Nulo
Prognóstico	Excelente
PSEUDO-HIPERPLASICO	
Frequência	<1%
Principais características	Tumor de baixo grau, afeta mucosa do prepúcio
Taxa de metástase	Nulo
Prognóstico	Excelente

Fonte: Guimarães et al.³⁰

Tabela 2 (continuação) - Classificação histopatológica dos carcinomas penianos

ADENOESCAMOSO	
Frequência	1-2%
Principais características	Tumor invasivo composto de áreas de diferenciação entre escamoso e glandular
Taxa de metástase	50%
Prognóstico	Bom
PSEUDOGLANDULAR	
Frequência	<1%
Principais características	Tumor invasivo composto por ninhos neoplásicos sólidos
Taxa de metástase	43%
Prognóstico	Desfavorável

Fonte: Guimarães et al.³⁰

A manifestação clínica mais comum do CaPe é uma ferida ou úlcera persistente, ou também uma tumoração localizada na glândula, prepúcio ou corpo do pênis. A presença de um desses sinais, associados a uma secreção (esmegma), pode ser uma indicação da neoplasia. Além da tumoração no pênis, a presença de gânglios inguinais palpáveis pode ser sinal de progressão da doença¹².

O CaPe apresenta um padrão de crescimento local e um padrão previsível de disseminação; local, regional e distante. É essencialmente uma doença loco-regional e a incidência de metástases distantes varia de 1% a 10%¹². Há alguns fatores patológicos que influenciam o prognóstico, mas a validação da maioria deles torna-se difícil por causa da grande variedade de protocolos clínicos, variação geográfica em estudos populacionais, e da metodologia aplicada. Vários destes marcadores clínicos e histopatológicos têm sido descritos como úteis na determinação do prognóstico, incluindo nomogramas que tentam prever a presença de metástase linfonodal³¹.

A presença de metástases em linfonodos é o fator de prognóstico mais importante nos pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis. Esse tipo de metástase é importante, não só para prognóstico, mas também para a avaliação de morbidade. Metástases em linfonodos inguinais geralmente estão relacionadas com o estágio do tumor, profundidade da invasão, tipo e grau histológico. A sobrevivência em cinco anos diminuiu drasticamente, sendo inferior a 40% em pacientes com metástases ganglionares. A presença de micro metástase não foi comprovada como fator prognóstico e foi demonstrado casos com depósitos micro metastáticos em análises de 217 linfonodos negativos de 11 pacientes com CaPe. Neste caso isolado não houve recorrência³².

A importância do grau histológico para o prognóstico do CaPe está bem documentada na literatura. Há uma relação consistente entre o grau histológico de diferenciação e metástase linfonodal. Recentemente, Velazquez et al.³³ demonstraram que o grau histológico é mais importante do que o nível da infiltração. A determinação do grau do tumor requer uma análise detalhada, devido à

presença de vários graus no mesmo tumor. A classificação de Broder é comumente usada por alguns autores, a fim de classificar os tumores nas classes 1-4. No entanto, o sistema de classificação mais comum é o de três graus: bem, moderadamente e pouco diferenciado. Tumores bem diferenciados não apresentam células anaplásicas; tumores moderadamente diferenciados apresentam menos de 50% de células anaplásicas e casos pouco diferenciados apresentam mais de 50% das células anaplásicas. Embora este sistema seja amplamente utilizado para a avaliação, existe falta de consenso em vários métodos de classificação.

Atualmente utiliza-se a classificação TNM, para estadiar os casos de CaPe³⁴ (Quadro 3).

Quadro 3 - Estádio TNM dos carcinomas penianos

T – Tumor primário TX - O tumor primário não pode ser avaliado To - Não há evidência de tumor primário Tis - carcinoma in situ Ta - carcinoma verrucoso não-invasivo, não associados à invasão destrutiva T1 - Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial T1a - Tumor que invade o tecido conjuntivo sub-epitelial sem invasão linfática e é pouco diferenciado ou indiferenciado (T1G1-2) T1b - Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial, sem/com invasão linfovascular ou é pouco diferenciado ou indiferenciado (T1G3-4) T2 - Tumor invade corpo esponjoso/cavernoso T3 - Tumor invade uretra T4 - Tumor invade outras estruturas adjacentes
N - Os linfonodos regionais NX - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados No - Ausência de linfonodo inguinal palpável ou visivelmente aumentado N1 - linfonodo palpável móvel unilateral inguinal N2 - palpáveis móveis bilaterais ou vários linfonodos inguinais N3 - massa fixa inguinal nodal ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral
M – Metástases distantes Mo - Sem metástases distantes M1 - Metástases distantes

Fonte: Pizzocaro et al.³⁴

DISCUSSÃO

O câncer de pênis é um tumor raro, com maior frequência em homens a partir dos 60 anos com pico de incidência aos 70 anos^{29,35,36}, embora possa atingir também os mais jovens. Bleeker et al.³⁵ fazem referência a sintomas primários, como a ferida para a detecção do câncer de pênis.

O tradicional modo de sobrevivência dos tumores necessita de crescimento celular desordenado e este aumento populacional de células requer migração e formação endotelial para a nova vascularização. O CD105 tem sido usado como marcador primordial quando necessita análise microvascular. A sensibilidade e especificidade do CD105 tem sido demonstrada superior aos marcadores conhecidos e mais amplamente utilizados, como o CD34, CD31 e VEGF³⁷.

Em um estudo publicado por HE et al.²³ foi verificado que a oncoproteína E6/E7, do HPV alto risco, tem fundamental importância no processo angiogênico, atuando diretamente com o HIF-1a, os autores propuseram que o aumento populacional de células provocado pela acelerada

proliferação induzida pelo HPV alto risco, tem ação direta por meio do Hif-1a, fazendo com que haja maior indução da expressão de VEGF e consequentemente maior crescimento vascular.

A relação entre CD105 versus Angiogênese está sendo bastante estudada, porém ainda não é difundida, não havendo muitas publicações sobre esta relação. Quando dados como estadiamento e grau histológico foram confrontados em carcinoma de pênis, não houve significância estatística nos estudos^{24,38}.

Brewer et al.³⁹ e Martone et al.⁴⁰ demonstraram em seus estudos (trato urinário, cervical e cabeça e pescoço) que a associação CD105/neovascularização está diretamente ligada ao processo de invasão vascular e consequentemente metástase. A alta Densidade Microvascular (MD) é preditor de mau prognóstico em determinados tumores, incluindo carcinoma de bexiga^{41,42}, próstata^{43,44}, rins e pênis⁴⁵. Entretanto, não é um padrão e alguns estudos não encontraram relação significativa entre a MD e os resultados encontrados^{46,47}, enquanto outros estudos encontraram que a maior MD está relacionada com melhor prognóstico^{48,49}.

Para que ocorra essa vascularização, o tumor precisa produzir seus substratos capazes de induzirem a formação de novos vasos e consequentemente a proliferação tumoral²⁰. Esses fatores favoráveis a angiogênese foram abordados no projeto por meio da expressão do VEGF, e seus receptores, VEGFR1 e VEGFR2. Um estudo proposto por Guimarães et al.⁷ sobre carcinoma gástrico observou associação inversa na expressão de VEGF comparando com estadiamento TNM.

Mutschall et al.⁵⁰ em estudo de câncer de colorretal verificaram ausência de correlação significativa entre expressão tumoral de VEGF e seus receptores com estadiamento TNM, por outro lado autores como Funaki et al.⁵¹ e Kazama et al.⁵² demonstraram que existe uma relação significativa entre expressão tumoral do VEGF em relação a metástase.

Um trabalho dos autores Lu et al.⁵³ demonstraram por meio de um estudo publicado que VEGF inibe a invasão tumoral através do complexo MET/VEGFR2, sendo esse MET um receptor tirosina kinase do HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) frequentemente desregulado em vários casos de tumor, promovendo proliferação celular. Esse estudo reforça a hipótese de que a expressão do VEGF em ação aos receptores, em especial o VEGFR2 atua como regulatório do processo angiogênico.

Para determinação da marcação vascular sanguínea, os autores utilizaram os marcadores o CD34 e CD31. A estimativa microscópica da densidade microvascular (MD) nos cortes

histológicos dos tecidos, por meio do estudo imunoistoquímico com marcadores endoteliais é amplamente disponível em diversos departamentos de patologia, entretanto essa medida também pode ser realizada por meio de sistemas digitais de análise de imagens. Um anticorpo bastante utilizado pelo mercado é o CD31, devido sua capacidade de marcar o endotélio vascular sanguíneo⁵⁴.

O estudo de Viacava et al.⁵⁵ em adenomas, não notou significância estatística em relação a nova vascularização para o marcador em questão, avaliando a MD. Já em contraste a MD determinada pelo CD31 foi significativa para o estudo de LIVEZANU et al.⁵⁶ no qual demonstrou através da expressão do anticorpo a determinação da vascularização de pacientes portadores de pterígio, notou-se significância estatística comparando o CD31 com MD inclusive associando-o com a expressão do marcador VEGF, porém parâmetros como idade, não houve valor significativo.

He et al.²³ fazem referência a super expressão da oncoproteína E6/E7 do HPV16/18 potencializa a angiogênese, fato este já descrito anteriormente por Cubilla et al.¹² e Chaux e Cubilla¹. Porém, em seu estudo realizado com outros marcadores angiogênicos como HIF-1a (Fator Indutor de Hipóxia) demonstrou que no carcinoma de pulmão HPV16 oncoproteína E6/E7 a angiogênese é dependente da expressão de HIF-1a e que esse subtipo de HPV potencializa a expressão do CD31 causando o processo de formação vascular, resultando assim na forte associação entre HPV e angiogênese. A literatura sobre tal anticorpo é controversa, pois encontram-se muitos trabalhos sendo favoráveis a este marcador como também existem outras dezenas de trabalhos demonstrando a não funcionalidade deste anticorpo.

Zätterström et al.⁵⁷ demonstraram por meio da expressão do CD34 em carcinoma oral que o grau da vascularização está associado diretamente com melhor sobrevida, diferente de Ranieri et al.⁵⁸ que não demonstraram essa relação. Al-Najar et al.⁵⁹ demonstraram que a MD por meio do CD34 está aumentada na área peritumoral, o que pode se relacionar com a invasão vascular e perineural.

Segundo Branca et al.⁶⁰ a expressão de VEGF e seus receptores também podem ser regulada pela expressão da oncoproteína E6 e pela perda de expressão de p53 selvagem. Os autores acreditam que esteja envolvido com o subtipo HPV16. Embora haja uma suposta relação entre a expressão de VEGF ser regulada também pela oncoproteína E6, ainda não há base científica o suficiente para comprovar essa hipótese, porém Cubilla et al.¹² relatam que o HPV16 oncoproteína E6/E7 tem ação promotora de tumor em carcinoma uterino por meio da estimulação do VEGF.

A infecção por HPV tida como a grande vilã dos carcinomas da região genital está presente em diversos casos (levando em consideração apenas o de alto risco, ou seja, aquele que tem capacidade efetiva de provocar tumor) o teste Padrão Ouro para a detecção é a PCR, pois demonstra mais sensibilidade e especificidade para a detecção e classificação do subtipo⁶¹.

A expressão de p16 é descrita como forte associação em pacientes HPV positivo¹², isso devido uma proteína quinase dependente de ciclina que promove a passagem das células basais do estágio G1 para a fase S do ciclo celular. Em células funcionais p16 atua na inativação das quinases dependente de ciclina que fosforila a proteína do retinoblastoma e a acumulação de pRb inibe a ativação de p16. Quando as células são infectadas por HPV alto risco, estas produzem E7 que se liga à pRb levando a inativação do controle negativo de p16, ocorrendo assim a super expressão de p16, sendo este, motivo para a associação com o HPV⁵.

Ao utilizar a técnica de imunoistoquímica para detecção de HPV por meio do marcador p16, a marcação precisa ser difusa e bem característica. Pacientes que contenham uma coloração fraca a moderada são considerados negativos para o marcador¹.

Oliveira-Costa et al.¹⁰ propuseram que a positividade do p16 pelo método de imunoistoquímica é variável de acordo com o subtipo histológico do carcinoma de pênis. O Warty mais frequentemente positivo que os demais, usualmente indeterminado. Em outros estudos como em carcinoma de cabeça e pescoço onde houve esse comparativo, os resultados não demonstraram relação direta, sendo considerado como um marcador não totalmente eficaz para a positividade do HPV⁶²⁻⁶⁴. o mesmo ocorre em carcinomas vulvares onde não há descrição de relação direta^{11,65}.

O câncer em geral é amplamente discutido, tanto molecularmente quanto clínico-patológico e um dos grandes focos atualmente tem sido o poder que determinado tumor tem em relação ao potencial metastático. Marcadores como CD34, CD31 e VEGF não mostraram ter uma relação totalmente direta entre HPV e angiogênese em carcinoma de pênis, provavelmente pela propriedade do órgão em questão, pois o pênis é bastante vascularizado. Faz parte da biologia deste órgão ser extremamente irrigado e estes marcadores são de vasos já formados, o que gera a seguinte questão: será que tais vasos marcados são próprios do pênis, foram causados pelo processo tumoral ou pelo processo tumoral em associação com o HPV? O grande revelador destas perguntas está na associação do CD105, este sim é um marcador mais específico, uma vez que o padrão de marcação é a neovascularogênese¹¹.

CONCLUSÃO

Os dados levantados na literatura demonstraram que apenas a neoangiogênese, marcada pelo CD105, esteve mais pronunciada em casos de câncer de pênis associados ao HPV de alto risco, devido ao fato de ser marcador de vasos neoformados. Isto aponta para um mecanismo adjuvante da neoangiogênese, promovida ou facilitada por esse vírus. Demais marcadores vasculares como CD31 e CD34 não demonstraram relação direta com a infecção pelo HPV, motivo este que pode ser o fato do pênis ser um órgão amplamente vascularizado. A análise da expressão protéica nas células neoplásicas dos marcadores VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 não demonstrou relação direta com o HPV.

Porém alguns autores associaram a expressão de VEGF e VEGFR1 com a presença de linfonodos comprometidos pela neoplasia, ou seja, com um indicador de pior prognóstico. A utilização da imunomarcagem da proteína p16INK4a como marcador da infecção pelo HPV demonstrou-se controversa, de todos os trabalhos analisados nessa revisão bibliográfica, não houve consenso entre a funcionalidade deste marcador como um marcador próprio para a relação direta com o HPV.

REFERÊNCIAS

1. Chaux A, Cubilla A. Advances in the pathology of penile carcinomas. *Human Pathol* 2012; 43:771-89.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Câncer de Pênis. [Internet]. INCA; 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/penis>
3. Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *Int Braz J Urol*. 2008; 34:587-93.
4. Crocetto F, Arcaniolo D, Napolitano L, Barone B, La Rocca R, Capece M et al. Impact of Sexual Activity on the Risk of Male Genital Tumors: A Systematic Review of the Literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(16):8500.
5. Carlson BC, Hofer MD, Ballek N, Yang XJ, Meeks JJ, Gonzalez CM. Protein markers of malignant potential in penile and vulvar lichen sclerosus. *J Urol*. 2013;190:399-406
6. Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, Zequi Sde C, Leal ML, Carvalho AL, da Cunha IW, Soares FA. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. *Urology*. 2006;68(1):148-53.
7. Guimarães GC, Rocha RM, Zequi SC, Cunha IW, Soares FA. Penile cancer: epidemiology and treatment. *Curr Oncol Rep*. 2011;13:231-9.
8. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:342-50.
9. Zequi Sde C, Guimarães GC, da Fonseca FP, Ferreira U, de Matheus WE, Reis LO et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer. A multicenter study. *J Sex Med*. 2012;9(7):1860-7.
10. Oliveira-Costa JP, Silveira GG, Soave DF et al. Human papillomavirus infection and penile cancer: past, present and future. In: Broek DV, editor. *Human papillomavirus and related diseases from bench to bedside a diagnostic and preventive perspective*. Croatia: Intech; 2011. p.221-40.
11. Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Melo Maia B, Stiepcich MM, Baiocchi G, Carvalho KC et al. Cell cycle suppressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma. *Tumour Biol*. 2013;34(6):3713-20.
12. Cubilla AL, Ayala G, Lopes A et al. Perineural invasion (PNI) predicts mortality in penile squamous cell carcinoma. A long-term outcome study comparing clinico-pathologic features. *Lab Invest* 2007; 87:142A.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Informações do Registro de Câncer de Base Populacional [Internet]. INCA; 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/BasePopIncidencias/Home.action>
» <https://www.inca.gov.br/BasePopIncidencias/Home.action>
14. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Informações de Saúde (TABNET). Assistência a Saúde [Internet]. Brasília (DF): DATASUS; 2019. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0202>
» <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0202>.
15. Valiatti FB, Crispim D, Benfica C, Valiatti BB, Kramer CK, Canani LH. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011;55:106-13.
16. Florence ME, Massuda JY, Bröcker EB, Metze K, Cintra ML, Souza EM. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers. *Clinics*. 2011;66:465-8.
17. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Tromb Haemost* 2005; 3:1835-42.
18. Martins Acp, Britto S, Takata C.; Cologna AJ, Tucci Jr S, Araújo WM. VEGF immunoexpression in penile carcinoma. *Acta Cir Bras*. 2002; 17(Suppl. 3):52-4.
19. Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol*. 2006; 168:639-48.

20. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267:10931-34.
21. Kalitin NN, Kostyukova MN, Kakpakova ES, Tupitsyn NN, Karamysheva AF. Expression of vascular endothelial growth factor receptors VEGFR1 in cultured multiple myeloma cells: correlation with immunophenotype and drug resistance. *Bull Exp Biol Med.* 2012; 153:882-5.
22. Dellinger MT, Meadows SM, Wynne K, Cleaver O, Brekken R. A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 promotes the development of the lymphatic vasculature. *PLoS One.* 2013; 8:e74686.
23. He L, Zhang E, Shi J, Li X, Zhou K, Zhang Q, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits human papillomavirus (HPV)-16 oncoprotein-induced angiogenesis in non-small cell lung cancer cells by targeting HIF-1a. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71:713-25.
24. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL, Cohen JK, Miller R et al Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(4):572-9.
25. Espinoza I, Pochampally R, Xing F, Watabe K, Miele L. Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther.* 2013;6:1249-59.
26. Samples J, Willis M, Klauber-Demore N. Targeting angiogenesis and the tumor microenvironment. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013;22:629-39.
27. Baigent SJ, Kgosana LB, Gamawa AA, Smith LP, Read AF, Nair VK. Relationship between levels of very virulent MDV in poultry dust and in feather tips from vaccinated chickens. *Avian Dis.* 2013; 57(Suppl):440-7.
28. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438:932-6.
29. Paula AAP, Netto JCA, Cruz AD, Júnior RF. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. *Rev Bras Cancerol.* 2005; 51:243-52.
30. Guimarães GC, Rocha RM, Zequi SC, Cunha IW, Soares FA. Penile cancer: epidemiology and treatment. *Curr Oncol Rep.* 2011;13(3):231-39.
31. Solsona E, Iborra I, Rubio J, Casanova JL, Ricós JV, Calabuig C. Prospective validation of the association of local tumor stage and grade as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal lymph nodes. *J Urol.* 2001;165:1506-9.
32. 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.
33. Velazquez EF, Soskin A, Bock A, Codas R, Cai G, Barreto JE et al. Epithelial abnormalities and precancerous lesions of anterior urethra in patients with penile carcinoma: a report of 89 cases. *Mod Pathol.* 2005;18(7):917-23.
34. Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H. et al. EAU penile cancer guidelines 2009. *Eur Urol.* 2010; 57:1002-12.
35. Bleeker MCG, Heideman D, Snijders PJF, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJLM. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol.* 2009; 27:141-50.
36. Calmon MF, Mota MT, Babeto É, Candido NM, Girol AP, Mendiburu CF et al. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. *PLoS One.* 2013;8(1):e53260.
37. Fang L, Choi SH, Baek JS, Liu C, Almazan F, Ulrich F et al. Control of angiogenesis by AIBP-mediated cholesterol efflux. *Nature.* 2013;498(7452):118-22.
38. Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Andrac-Meyer L, Ramuz O et al. CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patients. *Am J Clin Pathol.* 2003;119(3):374-80.
39. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, Johnston JM, Mann JL, Mcasey ME. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol.* 2000; 96:224-8.
40. Martone T, Rosso P, Albera R, Migliaretti G, Fraire F, Pignataro L et al. Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol.* 2005;41(2):147-55.
41. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldman FM et al. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol.* 1995;154(1):69-71.
42. Hawke CK, Delahunt B, Davidson PJ. Microvessel density as a prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol.* 1998; 81:585-90.
43. Hall MC, Troncoso P, Pollack A, Zhou HY, Zagars GK, Chung LW et al. Significance of tumor angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma treated with external beam radiotherapy. *Urology.* 1994;44(6):869-75.
44. Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Connelly RR, Moul JW. CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol.* 1998; 160:459-65.
45. Nativ O, Sabo E, Reiss A, Wald M, Madjar S, Moskovitz B et al. Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma. *Urology.* 1998;51:693-6.
46. Dinney CP, Babkowski RC, Antelo M, Perrotte P, Liebert M, Zhang HZ et al. Relationship among cystectomy, microvessel density and prognosis in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1998;160(4):1285-90.
47. Rubin MA, Buyyounouski M, Bagiella E, Sharir S, Neugut A, Benson M et al. Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage, and clinical outcome. *Urology.* 1999;53(3):542-7.

48. Kohler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz EW, Bittinger A. Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas. *Br J Urol.* 1996;77:650-4.
49. Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A. Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal cell carcinoma. *Br J Urol.* 1997; 80:401-4.
50. Mutschall L, França PC, Ferreira LE, Fronz JRH, Blasios R, Pinho M. Analysis of relationship between vegf protein expression and colorectal cancer staging. *Rev Bras Coloproct.* 2009;29:15-22.
51. Funaki H, Nishimura G, Harada S, Ninomiya I, Terada I, Fushida S et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. *Oncology.* 2003;64(4):416-22.
52. Kazama S, Kitayama J, Watanabe T, Nagawa H. Expression pattern of vascular endothelial growth factor-C in human colorectal normal mucosa and neoplastic mucosa. *Hepatogastroenterology.* 2004;51(56):391-5.
53. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell.* 2012;22(1):21-35.
54. Monteiro-Amado F, Castro-Silva II, Lima CJ, Soares FA, Kowalski LP, Granjeiro JM. Immunohistochemical evaluation of MMP-2, MMP-9 and CD31/microvascular density in squamous cell carcinomas of the floor of the mouth. *Braz Dent J.* 2013;24:3-9.
55. Viacava P, Gasperi M, Acerbi G, Manetti L, Cecconi E, Bonadio AG et al. Microvascular density and vascular endothelial growth factor expression in normal pituitary tissue and pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest.* 2003;26(1):23-8.
56. Livezeanu C, Crăițoiu MM, Mănescu R, Mocanu C, Crăițoiu S. Angiogenesis in the pathogenesis of pterygium. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52:837-44.
57. Zätterström UK, Brun E, Willén R, Kjellén E, Wennerberg J. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 1995; 17:312-8.
58. Ranieri G, Gasparini G. Surrogate markers of angiogenesis and metastasis. *Methods Mol Med* 2001;57:99-113.
59. Al-Najar A, Al-Sanabani S, Korda JB, Hegele A, Bolenz C, Herbst H et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2012;30(3):325-9.
60. Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Benedetto A et al. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59(1):40-7.
61. Arroyo LS, Smelov V, Bzhalava D, Eklund C, Hultin E, Dillner J. Next generation sequencing for human papillomavirus genotyping. *J Clin Virol.* 2013; 58:437-42.
62. Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in site-specific HPV positive and HPV negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Clin Oncol.* 2013; 2:51-61.
63. Rietbergen MM, Brakenhoff RH, Bloemena E, Witte BI, Snijders PJ, Heideman DA et al. Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol.* 2013;24(11):2740-5.
64. Robinson M, Suh YE, Paleri V, Devlin D, Ayaz B, Pertl L et al. Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population. *Infect Agent Cancer.* 2013;8(1):30.
65. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2013; 62:161-75.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Rafael de Lima Santos

Discente do Curso de Medicina

Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino (UNIFAE)

13870-377 São João da Boa Vista-SP, Brasil

Submetido em 04/10/2024

Aceito em 31/10/2024