

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E OFTALMOLOGIA**

**ANDRÉ LOPES SALAZAR**

**AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES DOS MARCADORES TUMORAIS GLUT-1,  
HEXOQUINASE-II, Ki-67, p53, p16 COM <sup>18</sup>F-FDG PET/CT EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE PÊNIS**

**BELO HORIZONTE**

**2022**

**ANDRÉ LOPES SALAZAR**

**AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES DOS MARCADORES TUMORAIS GLUT-1,  
HEXOQUINASE-II, Ki-67, p53, p16 COM <sup>18</sup>F-FDG PET/CT EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE PÊNIS**

**Versão Final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina  
da Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do título de Doutor

Área de Concentração: Cicatrização

Orientador: Prof. Marcelo Henrique Mamede Lewer

**BELO HORIZONTE**

**2022**

Salazar, André Lopes.

SA161a Avaliação das expressões dos marcadores tumorais GLUT-1, Hexoquinase-II, Ki-67, p53, p16 COM 18F-FDG PET/CT em pacientes com Câncer de Pênis [manuscrito]. / André Lopes Salazar. - - Belo Horizonte: 2022.

77f.: il.

Orientador (a): Marcelo Henrique Mamede Lewer.

Área de concentração: Cicatrização.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Penianas. 2. Tomografia por Emissão de Pósitrons combinada à Tomografia Computadorizada. 3. Fluordesoxiglucose F18. 4. Proteínas Facilitadoras de Transporte de Glucose. 5. Hexoquinase. 6. Genes p53. 7. Genes p16. 8. Papillomaviridae. 9. Dissertação Acadêmica. I. Lewer, Marcelo Henrique Mamede. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WJ 790

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES DOS MARCADORES TUMORAIS GLUT-1, HEXOQUINASE-II, KI-67, p53, p16 COM 18F-FDG PET/CT EM PACIENTES COM CÂNCER DE PÊNIS**

**ANDRÉ LOPES SALAZAR**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **dezessete de maio de dois mil e vinte e dois**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

**CRISTIANA BUZELIN NUNES**

UFMG

**BRUNO MELLO RODRIGUES DOS SANTOS**

UFMG

**PAULO HENRIQUE ROSADO DE CASTRO**

UFRJ

**HUMBERTO ELIAS LOPES**

UFJF

**MARCELO HENRIQUE MAMEDE LEWER - Orientador**

UFMG

Belo Horizonte, 17 de maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Buzelin Nunes, Membro**, em 18/05/2022, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Rosado de Castro, Usuário Externo**, em 18/05/2022, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mello Rodrigues dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 19/05/2022, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Henrique Mamede Lewer, Professor do Magistério Superior**, em 19/05/2022, às 21:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Elias Lopes, Usuário Externo**, em 29/05/2022, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1458809** e o código CRC **5166644F**.

*À minha esposa e aos meus filhos, razão de todo meu esforço.  
Aos meus pais, exemplos de moral e trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Mamede, meu orientador e grande amigo. Obrigado por acreditar na minha capacidade. Agradeço pelo seu tempo dedicado, paciência e ensinamentos compartilhados desde o mestrado.

Aos colegas Prof. Dr. Eduardo Paulino, Prof. Dr. Antonio Cubilla e ao Prof. Dr. Diego Sanchez; agradeço a dedicação e contribuição com as revisões de Anatomia Patológica e de Imuno-histoquímica da nossa amostra.

Aos futuros colegas João, Yuri e Matheus; obrigado pela dedicação na árdua tarefa de me auxiliarem na coleta do banco de dados.

À Profa. Renata Toscano Simões obrigado pelo auxílio na análise da Genotipagem do Papilomavírus Humano (HPV).

Agradeço às Professoras e Professores membros da minha banca de qualificação e defesa de Tese. Obrigado pela disponibilidade em participar e a todos os valores agregados que engrandeceram o trabalho final.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa.”**

Grande sertão: veredas - Página 16, de João Guimarães Rosa, 1956.

## Resumo

**Introdução:** O câncer de pênis (CP) é um tumor raro. Está associado à inflamação crônica e ao oncogênico vírus papiloma humano (HPV). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma espinocelular (CEC) tipo usual. A tomografia por emissão de pósitrons (PET) com Fluorodesoxiglicose (FDG) marcada com Fluor-18 ( $^{18}\text{F}$ ) ( $^{18}\text{F}$ -FDG) é uma ferramenta de avaliação do CP. As células cancerosas superexpressam os transportadores transmembranas de glicose (GLUT) e a hexoquinase (HK) durante o metabolismo elevado da glicose. Ki-67 é uma proteína nuclear ligada à replicação do DNA e sua maior expressão está relacionada à proliferação tumoral e ao pior prognóstico em CP. Os subtipos de HPV de alto risco estão relacionados às vias carcinogênicas no CP. As oncoproteínas do HPV estão associadas ao acúmulo da proteína supressora de tumor p16 e da proteína supressora de tumor p53 que controla a replicação do DNA.

**Objetivo:** Correlacionar a positividade em imuno-histoquímica (IHQ) de marcadores moleculares tumorais relacionados ao metabolismo da glicose, proliferação tumoral e infecção por HPV com a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG em pacientes com câncer de pênis.

**Métodos:** Cinquenta e um pacientes em CP foram selecionados de outubro de 2012 a outubro de 2014 e submetidos ao  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT para estadiamento. A análise semiquantitativa foi realizada utilizando o valor máximo de captação padronizado ( $\text{SUV}_{\text{bw}}$ ) e SUV volumétrico ( $\text{SUV}_{2\text{SD}}$ ). Das amostras de tumor, o DNA do HPV foi extraído. Três patologistas realizaram a análise IHQ para anti-GLUT-1, anti-HK-II, anti-Ki67, anti-p16 e anti-p53.

**Resultados:** Dos 51 pacientes analisados, 80,6% eram CEC invasivo do tipo usual. A infecção pelo HPV foi positiva em 52,4% dos 42 pacientes avaliados. Para todos os tipos histológicos, o CEC do tipo *Warty* apresentou o maior valor de SUV com diferenças significativas para  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  ( $p=0,022$ ) e  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  ( $p=0,022$ ), assim como foi observado significância estatística para tumores grau 3 para  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  ( $p=0,018$ ). Exclusivamente para o CEC invasivo tipo usual, os valores médios mais altos de  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  e  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  foram observados para tumores com grau histológico 3 ( $p=0,035$  e  $p=0,029$ , respectivamente), HPV+, p16 negativo, p53 negativo, índice 3 para GLUT-1 e índice 3 para HK-II. A avaliação dos pacientes através da expressão do marcador de proliferação tumoral (Ki-67) apresentaram diferenças estatísticas significativas para tumor grau 3 ( $p=0,001$ ) e índice HK-II 1 ( $p=0,036$ ). A positividade do Ki-67 também foi maior em tumores com HPV negativo, p16 status 2, p53 status 3 e GLUT-1 índice 3.

**Conclusão:** No Câncer de Pênis, a elevada captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG correlacionou-se com a maior expressão de marcadores do metabolismo glicolítico. Houve uma tendência de correlação positiva de aumento da expressão do marcador de transporte de glicose com maior grau histológico e maior expressão de Ki-67. Pacientes HPV negativos apresentaram resultados de PET/CT mais significativos para potencial proliferativo.

**Palavras-chave:** Neoplasia Peniana,  $^{18}\text{F}$ -FDG, PET/CT,  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT, GLUT-1, HK-II, Ki-67, p53, p16, HPV.

## Abstract

**Introduction:** Penile cancer (PC) is a rare tumor. It is associated with chronic inflammation and the oncogenic human papillomavirus (HPV). The most frequent histological type is the usual type of squamous cell carcinoma (SCC). Positron emission tomography (PET) with Fluorodeoxyglucose (FDG) labeled with Fluor-18 (18F) ( $^{18}\text{F}$ -FDG) is an assessment tool for PC. Cancer cells overexpress glucose transmembrane transporters (GLUT) and hexokinase (HK) during elevated glucose metabolism. High-risk HPV subtypes are related to carcinogenic pathways in PC. HPV oncoproteins are associated with the accumulation of p16 tumor suppressor protein and p53 tumor suppressor protein that controls DNA replication. Ki-67 is a nuclear protein linked to DNA replication, and its higher expression is related to tumor proliferation and worse prognosis in PC.

**Objective:** To correlate immunohistochemistry (IHC) positivity of tumor molecular markers related to glucose metabolism, tumor proliferation, and HPV infection with  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in penile cancer patients. **Methods:** Fifty-one PC patients were selected from October 2012 to October 2014 and underwent  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT for staging. Semiquantitative analysis was performed using standardized maximum uptake value ( $\text{SUV}_{\text{bw}}$ ) and volumetric SUV ( $\text{SUV}_{2\text{SD}}$ ). From the tumor samples, HPV DNA was extracted. Three pathologists performed IHC analysis for anti-Glut-1, anti-Hexokinase-II, anti-Ki67, anti-p16, and anti-p53.

**Results:** Of the 51 patients analyzed, 80.6% were invasive SCC of the usual type. HPV infection was positive in 52.4% of the 42 patients evaluated. For all histological types, Warty-type SCC had the highest SUV value with significant differences for  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  ( $p=0.022$ ) and  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  ( $p=0.022$ ), as well as statistical significance for grade 3 tumors for  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  ( $p=0.018$ ). Exclusively for usual-type invasive SCC, the highest mean  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  and  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  values were observed for tumors with histological grade 3 ( $p=0.035$  and  $p=0.029$ , respectively), HPV+, p16 negative, p53 negative, index 3 for GLUT-1 and index 3 for HK-II. The evaluation of patients through the expression of the tumor proliferation marker (Ki-67) showed statistically significant differences for grade 3 tumor ( $p=0.001$ ) and HK-II 1 index ( $p=0.036$ ). Ki-67 positivity was also higher in tumors with HPV negative, p16 status 2, p53 status three, and GLUT-1 index 3.

**Conclusion:** In penile cancer, the high uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG was correlated with the highest expression of markers of glycolytic metabolism. There was a positive correlation trend of increased expression of the glucose transport marker with higher

histological grade and higher expression of Ki-67. HPV negative patients had more significant PET/CT results for proliferative potential. There were no significant results regarding p16 and p53 positivity.

**Keywords: Penile Neoplasm, <sup>18</sup>F-FDG, PET/CT, <sup>18</sup>F-FDG PET/CT, GLUT-1, HK-II, Ki-67, p53, p16, HPV.**

**Lista de Figuras****Página**

FIGURA 1 – Correlações entre $^{18}\text{F}$ -FDG PET e marcadores moleculares tumorais.	58
FIGURA 2 - Marcadores Moleculares de Tumor e $^{18}\text{F}$ -FDG PET de um Exemplo Típico de CP	60
FIGURA 3 – Conexões dos Marcadores Moleculares do Câncer de Pênis e o SUVmax do $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT lesão primária peniana.	61

<b>Lista de Tabelas</b>	<b>Página</b>
Tabela 1 - Características histológicas e resultados do $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT dos pacientes com câncer de pênis	53
Tabela 2 - Características histológicas, resultados de imunohistoquímica e de PET/CT com $^{18}\text{F}$ -FDG de pacientes com câncer de pênis com CEC invasivo usual	55
Tabela 3 – Coeficientes de Correlação	57
Tabela 4 - Análise Qui-Quadrado de marcadores moleculares e grau tumoral	59

## Lista de Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Descrição</b>
<sup>18</sup> F	Flúor-18
<sup>18</sup> F-FDG	Fluorodesoxiglicose marcada com Flúor-18
<sup>18</sup> F-FDG-6-P	Fluorodesoxiglicose marcada com Flúor-18 fosforilada
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> (Comitê Americano em Câncer)
ATP	Adenosina Tri-fosfato
<i>c-MYC</i>	Oncogene <i>c-MYC</i>
CEC	Carcinoma espinocelular
CCE	Carcinoma células escamosas
CDK	Cinases dependentes de ciclina
cN	Classificação clínica linfonodal
cN-	Linfonodo negativo clinicamente
cN+	Linfonodo positivo clinicamente
cN1	Linfonodo positivo clinicamente categoria 1 TNM
cN2	Linfonodo positivo clinicamente categoria 2 TNM
cN3	Linfonodo positivo clinicamente categoria 3 TNM
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COEP - UFMG	Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
COX2	Ciclooxigenase tipo 2
CP	Câncer de pênis
CT	<i>Computed Tomography</i> - Tomografia computadorizada
cT	Classificação do tumor clinicamente
CTMM	Centro de Tecnologia em Medicina Molecular
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DSNB	Biópsia dinâmica do linfonodo sentinela
E6	Oncoproteína E6 do HPV
E7	Oncoproteína E7 do HPV
FDG	Fluorodesoxiglicose
FH	Fumarato hidratase

G1	Fase G1 divisão celular
G2	Fase G2 divisão celular
G1	Grau histológico tumoral 1
G2	Grau histológico tumoral 2
G3	Grau histológico tumoral 3
G6P	Glicose 6 fosfato
GLUT	<i>Glucose transporter</i> (Transportador de glicose)
GLUT-1	<i>Glucose transporter 1</i> (Transportador de glicose 1)
GLUT-3	<i>Glucose transporter 3</i> (Transportador de glicose 3)
HK	Hexoquinase
HK-II	Hexoquinase tipo 2
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i>
HPV-	<i>Human Papilloma Virus</i> negativo
HPV+	<i>Human Papilloma Virus</i> positivo
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> (Imuno-histoquímica)
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IQI	<i>Interquartile interval</i> (Intervalo Interquartil)
IQR	Intervalo Interquartil
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i> (Sociedade Internacional de Patologia Urológica)
KeV	Quiloelétron-volt
Ki-67	Antígeno Ki-67
LN-	Linfonodos negativos
LN+	Linfonodos positivos
LND	Linfadenectomia
LSD	Desvio padrão do valor de captação
LVI	Linfovascular
METS+	Metástases positivas
Mmol	Milimol
$\mu m$	Micrômetro
MBq/Kg	<i>Megabecquerel per kilogram</i>

mCi/Kg	<i>Millicurie per kilogram</i>
Mg/dL	Miligramas por decilitro
Nd:YAG	Neodymium-doped yttrium aluminum garnet Laser
nSUV	<i>Standardized uptake value</i> linfonodal
p	Probabilidade de significância
pH	Unidade de medida de acidez e basicidade
p16 <sup>INK4a</sup>	Proteína supressora tumoral <i>p16</i>
<i>P16</i>	Proteína supressora tumoral <i>p16</i>
<i>p53</i>	Gene supressor tumoral <i>p53</i>
<i>pRb</i>	Proteína supressora tumoral <i>pRb</i> – do retinoblastoma
PC	<i>Penile Cancer</i> (Câncer de Pênis)
PCNA	Antígeno nuclear de célula proliferante
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PET	<i>Positron Emission Tomograph</i> (Tomografia por emissão de pósitrons)
PET/CT	Tomografia por emissão de pósitrons
PET/RM	Ressonância magnética por emissão de pósitrons
PeIN	Neoplasia intraepitelial peniana
PGE2	Prostaglandina E2
PKM2	Piruvato quinase 2
pM	Classificação das metástases pelo sistema TNM patológico
pN	Classificação dos linfonodos pelo sistema TNM patológico
pN-	Linfonodo negativo patológico
pN+	Linfonodo positivo patológico
pN1	Linfonodos pelo sistema TNM patológico categoria 1
pN2	Linfonodos pelo sistema TNM patológico categoria 2
pN3	Linfonodos pelo sistema TNM patológico categoria 3
pSUV	<i>Standardized uptake value</i> peniano
pT	Classificação dos tumores pelo sistema TNM patológico
pT1	Classificação dos tumores TNM patológico categoria 1
pT1a	Classificação dos tumores TNM patológico categoria 1a
pT1b	Classificação dos tumores TNM patológico categoria 1b
pT2	Classificação dos tumores TNM patológico categoria 2
pT3	Classificação dos tumores TNM patológico categoria 3

Q1	Primeiro quartil
Q3	Terceiro quartil
Rb	Retinoblastoma
RM	Ressonância magnética
ROI	<i>Region of Interest</i> - Região de interesse
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i> (carcinoma celular escamoso)
RTK	Receptores de tirosina quinase
S	Fase S divisão celular
SD	Standard deviation (Desvio Padrão)
SDH	Succinato desidrogenase
SUV	<i>Standardized uptake value</i>
SUV <sub>max</sub>	<i>Standardized uptake value</i> máximo - (Valor de Captação Padronizado máximo)
SUV <sub>bw</sub>	<i>Standardized uptake value body weight</i> - (Valor de Captação Padronizado ajustado pela massa corporal)
SUV <sub>2SD</sub>	<i>Standardized uptake value</i> volumétrico - (Valor de Captação Padronizado volumétrico)
TMA	<i>Tissue Microarray</i> - (Microarranjo Tecidual)
T <sub>max</sub>	Voxel tumoral com captação máxima
TNM	<i>Tumor Nodes Metastasis</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> - (Fator de Crescimento Vascular Endotelial)
Vol2SD	Volumes da lesão alvo
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO/ REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
<b>1.1- O Câncer de Pênis</b>	<b>19</b>
1.1.1 - Epidemiologia	19
1.1.2 - Fatores de risco	19
1.1.3 - Patologia	22
1.1.4 – Diagnóstico	23
1.1.5 - Tratamento	26
1.1.6 - Estadiamento TNM	29
<b>1.2- <sup>18</sup>F-FDG PET/CT no Câncer de Pênis</b>	<b>31</b>
1.2.1 - PET com <sup>18</sup> F-Fluorodeoxiglicose ( <sup>18</sup> F-FDG)	31
1.2.2 - <sup>18</sup> F-FDG PET/CT no Câncer de Pênis	35
<b>1.3- Os Marcadores Tumorais</b>	<b>37</b>
1.3.1 - GLUT-1	37
1.3.2 - Hexoquinase-II	39
1.3.3 - Ki-67	40
1.3.4 - p16	41
1.3.5 - p53	42
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<b>2.1 - Principal</b>	<b>44</b>
<b>2.2 - Secundários</b>	<b>44</b>
<b>3- ESTRUTURA DO ARTIGO</b>	<b>45</b>
<b>3.1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>45</b>
<b>3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
3.2.1 - Indivíduos do Estudo	49
3.2.2 - Análise Histopatológica	47
3.2.3 - TMA e IHQ	47
3.2.4 - DNA do HPV	49
3.2.5 - Análise de Imagem <sup>18</sup> F-FDG PET/CT	49
3.2.6 - Análise Estatística	50
<b>3.3– RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b>3.3.1 - Achados Histopatológicos</b>	<b>50</b>
<b>3.3.2 - PET/CT de <sup>18</sup>F-FDG e marcadores tumorais</b>	<b>50</b>

<b>3.4- DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>3.5- CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>
<b>4 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>68</b>
<b>5- ANEXOS</b>	<b>79</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO/ REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>21</b>
<b>1.1- O Câncer de Pênis</b>	<b>21</b>
1.1.1 - Epidemiologia	21
1.1.2 - Fatores de risco	21
1.1.3 - Patologia	24
1.1.4 – Diagnóstico	25
1.1.5 - Tratamento	28
1.1.6 - Estadiamento TNM	31
<b>1.2- <sup>18</sup>F-FDG PET/CT no Câncer de Pênis</b>	<b>33</b>
1.2.1 - PET com <sup>18</sup> F-Fluorodeoxiglicose ( <sup>18</sup> F-FDG)	33
1.2.2 - <sup>18</sup> F-FDG PET/CT no Câncer de Pênis	37
<b>1.3- Os Marcadores Tumorais</b>	<b>39</b>
1.3.1 - GLUT-1	39
1.3.2 - Hexoquinase-II	41
1.3.3 - Ki-67	42
1.3.4 - p16	43
1.3.5 - p53	44
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
<b>2.1 - Principal</b>	<b>46</b>
<b>2.2 - Secundários</b>	<b>46</b>
<b>3- ESTRUTURA DO ARTIGO</b>	<b>47</b>
<b>3.1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>47</b>
<b>3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
3.2.1 - Indivíduos do Estudo	49
3.2.2 - Análise Histopatológica	49
3.2.3 - TMA e IHQ	49
3.2.4 - DNA do HPV	51
3.2.5 - Análise de Imagem <sup>18</sup> F-FDG PET/CT	51

3.2.6 - Análise Estatística	52
<b>3.3- RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>3.3.1 - Achados Histopatológicos</b>	<b>52</b>
<b>3.3.2 - PET/CT de <sup>18</sup>F-FDG e marcadores tumorais</b>	<b>52</b>
<b>3.4- DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>3.5- CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>
<b>4 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>68</b>
<b>5- ANEXOS</b>	<b>79</b>

## **1 - INTRODUÇÃO / REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1- O Câncer de Pênis**

#### **1.1.1- Epidemiologia**

O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia maligna rara no mundo. Na Europa Ocidental e na América do Norte observam-se baixa prevalência e variação na ocorrência de acordo com o desenvolvimento social de cada região. A *American Cancer Society* estima, nos Estados Unidos, para o ano de 2022, cerca de 2.070 novos casos e 470 mortes por CP, com uma incidência de 1/100.000 homens/ano (*AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022*) (DOUGLAWI, 2019).

Em regiões com menor desenvolvimento social como na América Latina, África e alguns países Asiáticos, o CP apresenta prevalência mais significativa. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) indicam o CP representando 2% dos cânceres em homens. Os dados Brasileiros, semelhante às outras áreas no mundo, refletem variação na ocorrência de acordo com o desenvolvimento socioeconômico de cada localidade. Dessa forma, ocorre maior prevalência em regiões menos desenvolvidas, principalmente no Norte e Nordeste do país. Recente estudo acerca da epidemiologia do CP no Brasil e no mundo, concluiu que o estado do Maranhão tem a maior incidência global desta doença, chegando a 6,1/100.000 em homens. Destaca-se maior ocorrência em indivíduos jovens e com doença mais avançada ao diagnóstico. Os resultados indicam a relevância do tema e a necessidade de mais estudos sobre esta neoplasia, além de sugerir o CP como um problema Nacional de saúde pública. (INCA, 2021) (COELHO,2018).

O pico de ocorrência do CP é na sexta década de vida, porém não são raros os casos em pacientes adultos jovens. As regiões com menor desenvolvimento social e econômico e com maior incidência do CP, representam locais com população mais jovem e, dessa forma, com maior ocorrência da doença em adultos também mais jovens (CLARK, 2013) (COELHO,2018).

#### **1.1.2- Fatores de risco**

*A) Inflamação crônica*

A inflamação crônica é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento do CP. Existe direta relação entre alterações teciduais causadas pela inflamação de longa duração e a carcinogênese no pênis. Mediadores da inflamação como a ciclooxigenase tipo 2 (COX2) e a prostaglandina E2 (PGE2) estão super-expressos em análises moleculares de tumores penianos. As reações resultantes da presença destes elementos são responsáveis por liberar compostos específicos, como o oxigênio reativo e derivados nitrogenados. A elevada concentração destes compostos, que ocorre no microambiente inflamatório, causa danos no DNA (Ácido Desoxirribonucleico), iniciando o processo de formação do câncer. Um dos mecanismos mais elucidados desta alteração genética é a interferência ao gene *p16* com consequente inibição da supressão tumoral. Essa perda de heterozigose é intimamente relacionada à carcinogênese no CP (COUSSENS, 2002).

A ocorrência peniana de excesso do prepúcio ou de fimose, estenose do prepúcio impedindo a exposição da glândula, são considerados fatores de risco para o CP. Estas condições podem induzir ao acúmulo de impurezas e à inflamação crônica. Deve-se salientar que a precária condição sócio-cultural, baixa escolaridade e hábitos de higiene inadequados também contribuem para agravar este quadro. As balanopostites crônicas do tipo intertrigo ou fúngicas, como o líquen escleroatrófico, também apresentam correlação positiva com início do CP (KOIFMAN, 2011).

#### *B) Vírus oncogênicos – Human Papilloma Virus (HPV)*

Diversos vírus têm papel definido na carcinogênese de diferentes tumores, como os vírus da hepatite B e C, dentre outros. O papilomavírus ou *Human Papilloma Virus* (HPV), há mais de 35 anos, vem sendo estudado em relação aos cânceres humanos. Os subtipos mais relacionados são o 16, 18, 31 e 33, com correlação direta na carcinogênese de tumores de orofaringe, anorretal e colo uterino. O DNA do HPV é encontrado em mais de 90% das células tumorais dos cânceres cervicais. No Brasil, desde 2014, a vacina quadrivalente contra o HPV entrou no programa nacional de imunização. Inicialmente a cobertura alvo era jovens do sexo feminino entre 9 e 13 anos. Em 2017, o programa foi estendido aos adolescentes masculinos entre 11 e 13 anos. Esta estratégia de vacinação representa a primeira prevenção direta desenvolvida para proteção contra um câncer humano, o câncer de colo uterino (ZUR HAUSEN, 2009) (MENDES LOBÃO, 2018).

Em relação ao câncer de pênis, o DNA do HPV pode ser encontrado em até metade dos tumores, sendo os subtipos 16 e 18 os mais frequentes, conotando a ação destes vírus também neste câncer. Sabe-se que a etiologia do CP é multifatorial, porém, atualmente, juntamente com a inflamação crônica, a infecção pelo papilomavírus são considerados os principais fatores de risco para desenvolvimento do CP (MADSEN, 2008) (KIDD, 2017).

O mecanismo da patogênese causada pelos vírus é complexo. Existem evidências de que a incorporação do DNA do HPV altera a inibição de genes supressores tumorais como *p53*, *pRb* e *p16*. Por outro lado, perda de heterozigose é frequentemente encontrada nos cromossomos *2q*, *6p*, *9p*, *12q* e *17p3* que são áreas também ligadas à supressão tumoral e essas perdas estão relacionada também ao HPV (RUBIN, 2001).

Existe evidência da relação direta da inserção do DNA do HPV subtipo 16 como possível causador do aumento de atividade do proto-oncogene *cMYC*. Essa amplificação da atividade está relacionada à carcinogênese em tumores genitais e conseqüentemente no CP. Chama atenção os pacientes com superexpressão do *cMYC* que geralmente evoluem com maior progressão tumoral local e pior sobrevida câncer específica (PETER, 2006).

Observa-se relação direta entre aumento dos casos de infecção de HPV em uma população com aumento da ocorrência do CP. Entre 1973 e 2002, nos Estados Unidos, observou-se uma queda na incidência global do CP, fenômeno também observado na Dinamarca. Porém, esses e outros países observaram elevação recente nessas taxas, o que ocorreu em paralelo com aumento da ocorrência de cânceres de orofaringe e pênis relacionados à infecção do HPV, além de mudanças nas práticas sexuais, conforme descrito anteriormente. Isto corrobora, mais uma vez, que existe relação de risco na contaminação por estes vírus e a ocorrência desta neoplasia, justificando o esforço nas campanhas de vacinação para prevenção desta contaminação. (LONT, 2006) (KIDD, 2017) (DJAJADININGRAT, 2015).

### C) Tabagismo

Estudos pré-clínicos demonstraram que derivados do tabaco como a N-Nitrosodietillanina, sabidamente carcinógenos, são secretados na urina em elevada concentração. Tais achados sugerem que estes elementos secretados na urina humana contaminam as glândulas sebáceas do prepúcio. A retenção crônica destes derivados nessa região se relaciona à carcinogêneses e à diferenciação tumoral peniana. Dessa

forma, o tabagismo está relacionado ao risco aumentado do câncer de pênis, porém não existe uma comprovação direta desta relação (CHAKIRYAN, 2021).

#### *D) Hábitos sexuais*

Existe correlação direta entre o início precoce das atividades sexuais, práticas promíscuas, parceiros múltiplos, sexo oral, sexo anal e zoofilia com maior risco de se desenvolver o câncer de pênis (MADSEN, 2008).

### **1.1.3- Patologia**

O tipo histológico mais frequente de tumor de pênis é o carcinoma espinocelular (CEC) ou epidermoide, também denominado de carcinoma de células escamosas (CCE). Esse tipo histológico corresponde a cerca de 95% dos tumores. São derivados dos ceratinócitos da epiderma. Cursam geralmente com elevada proliferação celular e necrose tumoral (CUBILLA, 1993). Existem diferentes subtipos histológicos com diferentes padrões de crescimento e agressividade clínica, alguns deles associados à infecção pelo HPV. A ocorrência de mais de um tipo histológico no mesmo tumor é extremamente comum. (OERTELL, 2011).

Em 2016, a *World Health Organization* (WHO) apresentou importante atualização na classificação histológica dos tumores penianos, reconhecendo a importância do HPV como fator etiológico (MOCH, 2016). A nova classificação concentra-se na presença ou não do HPV, avaliada através da marcação imuno-histoquímica para o antígeno p16. Tendo em vista a nova classificação, no início de 2018, a *International Society of Urological Pathology* (ISUP) elaborou recomendações gerais para utilização prática da atualização de acordo com a proposta apresentada pela WHO. O consenso dos especialistas determinou diretrizes para o público médico em geral (CUBILLA, 2018).

O carcinoma espinocelular peniano invasivo é precedido por uma lesão denominada neoplasia intraepitelial peniana (PeIN). Representa uma lesão caracterizada por alterações displásicas do epitélio, porém sem infiltração da membrana basal epitelial. A PeIN, não relacionada ao HPV, é denominada do tipo diferenciado. Os tipos basaloide e condilomatoso geralmente estão associados ao HPV, havendo formas mistas. O carcinoma invasor, na maioria das vezes, é representado pelo CCE do tipo usual, seguido dos tipos basaloide e sarcomatoide. (MOCH,2016).

O grau histológico, segundo a WHO/ISUP, varia de 1 a 3. Sendo de grau 1 os tumores bem diferenciados e os de grau 3 pouco diferenciados. Todos aqueles que não se enquadrem nestas duas categorias são referidos como moderadamente diferenciados (grau 2). Ainda, podem ser ceratinizantes ou não ceratinizantes, caso haja produção de ceratina, com a formação de pérolas córneas. Quanto maior a semelhança com o epitélio escamoso normal, mais bem diferenciado é o tumor. Os tumores pouco diferenciados formam ninhos e massas, sem ceratinização, com células pleomórficas atípicas (MOCH,2016).

A maioria dos tumores está associado ao HPV. A detecção do vírus do papiloma humano se dá por técnica de PCR (*Polimerase chain reaction*), de custo mais elevado. A concordância entre a detecção do HPV por PCR e exame de imuno-histoquímico (IHQ) alcança 84% (CUBILLA, 2011). Dentre os CCE HPV+ encontram-se os subtipos basaloide (clássico e papilar), condilomatoso (clássico, basaloide e de células claras) e o linfopitelioma-símile. Dentre os HPV- encontram-se o CCE do tipo usual, pseudoglandular e pseudohiperplásico, além do carcinoma verrucoso (puro ou cuniculatum), papilar, adenoescamoso e sarcomatoide, havendo formas mistas (CUBILLA, 2018).

A profundidade de infiltração tumoral deve ser sempre avaliada e citada na análise dos espécimes, por estar proporcionalmente relacionada à agressividade. Tumores pequenos e limitados às camadas superficiais da derme/cório apresentam evolução favorável. Seguindo este raciocínio, a invasão tumoral dos corpos cavernosos penianos é importante fator de evolução desfavorável. A invasão perineural e dos corpos cavernosos, bem como o grau histológico, são fatores preditores de infiltração linfática e de disseminação metastática, logo, de pior prognóstico. (CUBILLA, 2009) (SANCHES, 2015).

#### **1.1.4- Diagnóstico**

##### *A) Clínico*

Usualmente o CP se apresenta como uma lesão tumoral típica, ou seja, uma tumefação ulcerada na superfície peniana. Pode estar associada à presença de infecção e necrose e dor local. O local mais frequente de acometimento é a porção distal do pênis. Não é infrequente a apresentação inicial através de uma tumoração envolvida pelo prepúcio associada à fimose. Ou até fimose acompanhada de uma lesão inguinal

ulcerada já sugerindo acometimento metastático inguinal. Estas variações reiteram a importância do exame físico detalhado de toda genitália (AFONSO, 2016).

No exame inicial, a avaliação clínica dos linfonodos que drenam o pênis é fundamental. A drenagem da pele peniana ocorre para os linfonodos inguinais superficiais. Os tecidos mais profundos do pênis, como os corpos esponjosos e cavernosos, drenam para a cadeia linfonodal inguinal profunda. A drenagem inguinal ocorre para as cadeias dos linfonodos ilíacos e obturatórios na pelve. Dessa forma, após o acometimento metastático dos linfonodos inguinais, a disseminação segue para os linfonodos pélvicos ilíacos. A ordem de lateralidade não é obrigatória, podendo ocorrer uma drenagem anárquica que também não obedece a sequência de profundidade. Durante o exame físico do paciente, a palpação da região inguinal deve ser realizada bilateralmente e de forma cuidadosa. Importante detalhar a presença de linfonodos palpáveis e suas características (número, edema, consistência) ou até evidência de lesões ulceradas. A obesidade ou mesmo inexperiência do examinador são fatores que limitam os resultados deste exame clínico (ALKATOUT, 2011).

## *B) Complementar*

### *B.1) Lesão peniana*

O uso de exames de imagem ou métodos de diagnóstico complementares para o estadiamento ou avaliação clínica do tumor primário no CP é controverso. O diagnóstico, na maioria das vezes, tem como base o exame clínico e as informações da biópsia, principalmente em se tratando de lesões sem o aspecto tumoral típico.

O ultrassom peniano pode ser utilizado para análise da profundidade da infiltração tumoral e o acometimento dos corpos cavernosos e esponjosos, porém com limitados resultados e pouca aplicabilidade (LONT, 2003). A ressonância magnética (RM) peniana, associada à ereção farmacológica induzida, apresenta resultados mais consistentes. Esta pode fornecer informações com significativa acurácia acerca do acometimento dos corpos cavernosos. Porém, é um procedimento de considerável morbidade ao paciente e de difícil reprodutibilidade, tornando-a de pouco uso prático (PETRALIA, 2008) (HANCHANALE, 2016). Mais recentemente, o ultrassom associado ao *doppler* peniano, também com emprego da ereção fármaco-induzida, apresentou resultados promissores ao se avaliar a invasão das lesões tumorais penianas

quando comparado à RM. Da mesma forma, não é utilizado rotineiramente, e sim em protocolos de pesquisa (BOZZINI, 2016).

## *B.2) Linfonodos Regionais*

### *B.2.1) Pacientes sem linfonodos inguinais palpáveis (cN-)*

Os pacientes com o exame físico da região inguinal normal e sem linfonodos palpáveis, não estão isentos da possibilidade de doença linfonodal. As metástases microscópicas ocultas podem ocorrer em cerca de 25% dos casos e não são detectadas somente com o exame clínico (HUGHES,2010).

O ultrassom inguinal pode auxiliar na detecção de linfonodos aumentados, fixos e suspeitos, geralmente encontrados no exame físico. Parâmetros da imagem como a relação do diâmetro transverso/longitudinal e avaliação do hilo linfonodal têm baixa sensibilidade (68%) e, dessa forma, este método não é utilizado rotineiramente (KRISHNA, 2008).

A tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) isoladas não conseguem auxiliar no diagnóstico, principalmente em relação às metástases mínimas e não são rotineiramente utilizados (MUELLER-LISSE, 2008).

Os pacientes cN- devem ser estratificados de acordo com o risco de acometimento metastático linfonodal. Nos tumores com invasão do tecido conjuntivo subepitelial associado à presença de invasão linfovascular ou com grau histológico tumoral acima de G2 (maior que pT1 G2) são considerados de alto risco (ORNELLAS, 2008).

Nas lesões tumorais classificadas no grupo de alto risco, deve-se buscar ativamente o acometimento linfonodal, uma vez que não há métodos de imagem não invasivos totalmente estabelecidos para esta avaliação. Indica-se, para tal, a biópsia dirigida através do linfonodo sentinela ou mesmo a linfadenectomia inguinal técnica tradicional ou modificada (superficial).

A técnica de linfonodo sentinela para avaliação dos nódulos regionais nos tumores penianos mais indicada é denominada DSNB (*Dynamic sentinel-node biopsy*). A DSNB consiste na tentativa de detecção do linfonodo para o qual drena a lesão peniana através da cintilografia com a utilização do nano-coloide marcado com Tecnécio-99m. É um método de difícil reprodução, necessita de treinamento extenso para sua realização e leitura dos resultados. Mesmo nos poucos centros com experiência, a DSNB pode apresentar cerca de 15% de falsos negativos em pacientes de alto risco. Em recente

meta-análise acerca deste método, os autores concluíram que é uma modalidade de estadiamento promissora nos pacientes cN-, porém deve ser realizada através de uma abordagem multidisciplinar com uso do ultrassom inguinal prévio, punção com agulha fina e, se possível, exploração cirúrgica imediata objetivando a potencialização dos resultados (ZOU, 2016). O risco de falha desta avaliação deve ser sempre considerado de grande prejuízo nos pacientes de alto risco, uma vez que a recorrência tardia dificulta enormemente a reavaliação da região inguinal devido à destruição do padrão inicial de drenagem linfática (KIRRANDER, 2013).

#### *B.2.2) Pacientes com linfonodos inguinais palpáveis (cN+)*

A ocorrência de linfonodos inguinais palpáveis está associada à doença metastática tumoral em mais da metade dos casos. Por outro lado, pode se tratar de linfonodos inflamatórios, secundários à infecção característica do tumor peniano. A TC e a RM não tem boa acurácia na diferenciação entre inflamação e acometimento tumoral. Os exames de imagem têm sua maior indicação em auxiliar na definição da viabilidade da ressecção cirúrgica das lesões grandes e fixas, bem como uma melhor avaliação da região inguinal em pacientes obesos (KAYRES, 2007) (GRAAFLAND, 2011).

Nos pacientes cN+, a TC associada ao PET com uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG apresenta atualmente robustos resultados na avaliação do possível acometimento metastático linfonodal pelo CP. Porém sua utilização mais frequente é limitada pelo custo elevado e dificuldade de acesso ao exame. O uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT nos pacientes com câncer de pênis será discutido mais extensivamente em sessão específica *a posteriori* (VRIES, 2019).

#### *B.2.3) Metástases à distância em pacientes com linfonodos inguinais palpáveis (cN+)*

O estadiamento sistêmico para detecção de metástases à distância deve ser realizado em pacientes com linfonodos inguinais clinicamente positivos. O uso da TC abdominal e pélvica deve ser realizado associado à radiografia de tórax ou, se possível, à TC de tórax, uma vez que esta é mais sensível e detecta tumores menores que 3mm (ZHU, 2008). Nesta avaliação o uso do PET/CT também apresenta potencial de resultados favoráveis.

### **1.1.5- Tratamento**

### *A) Lesão primária*

O princípio do tratamento da lesão tumoral peniana é a ressecção completa do tumor com margens livres e, se possível, a manutenção de um coto peniano adequado para micção ou até atividade sexual. O dilema entre o controle oncológico adequado e a preservação da função é determinado pelo estadiamento local. A recidiva tumoral tem contribuição controversa na sobrevida, porém exige tratamento mais agressivo e com componente mórbido maior (LEITJE, 2008).

Em tumores pequenos e superficiais, podem-se utilizar terapias locais com uso de medicações tópicas visando tratamento minimamente invasivo. A associação da postectomia com o uso de drogas tópicas como o imiquimode ou 5-fluoracil é o tratamento de primeira linha, com elevadas taxas de cura, em torno de 74%. Importante ressaltar que o tratamento local tópico necessita de acompanhamento rigoroso no seguimento pós-operatório com biópsias sequenciais (ALNAJJAR, 2012).

Nas lesões maiores e de até cerca de 4 cm no maior diâmetro, outras terapias objetivam a cura com menor morbidade local. O uso do laser de CO<sub>2</sub> ou Nd:YAG laser associados ou não à radioterapia ou ressecção cirúrgica local e até cirurgia micrográfica; tem indicações seguras neste grupo de pacientes. O principal objetivo neste estágio tumoral é associar o seguro controle local com a preservação de um coto peniano adequado (MACHAN, 2016) (LI, 2011). Séries retrospectivas demonstraram que as terapias cirúrgicas ou minimamente invasivas apresentaram elevadas taxas de recidiva, em torno de 18%, e com a maioria recorrendo nos primeiros 36 meses após a cirurgia. Porém, aparentemente, após o tratamento definitivo com amputação parcial, não há comprometimento na sobrevida câncer específica (DJAJADININGRAT, 2014).

Nas lesões maiores que 4 cm, o tratamento padrão é a amputação parcial. A técnica cirúrgica preconiza uma margem de ressecção de cerca de 5 mm e a manutenção de um coto peniano em torno de 4 cm para permitir a micção sem prejuízo funcional. Esta técnica cirúrgica garante uma sobrevida câncer específica em 5 anos em torno de 85% (VEERATTERAPILLAY, 2015).

Os grandes tumores penianos com acometimento de toda haste peniana, ou até escroto, podem necessitar de cirurgias mais extensas e mutiladoras. Muitas vezes com a confecção de uretostomia perineal ou até cistostomia para micção ou drenagem urinária. Estes tumores são mais raros e representam somente 5% nas séries europeias e 13% dos tumores no Brasil. Em pacientes considerados inoperáveis devido ao extenso

acometimento local, a quimioterapia neoadjuvante e cirurgia paliativa nos pacientes que responderem ao tratamento é a opção preconizada (ORNELLAS, 2008).

### *B) Linfonodos*

O carcinoma espinocelular peniano tem como característica a disseminação metastática linfática. Metástases hematogênicas à distância ocorrem em menos de 5% dos casos. Dessa forma, o correto tratamento dos linfonodos inguinais é considerado o ponto crucial no tratamento do câncer de pênis. O desenvolvimento das metástases linfonodais segue a ordem anatômica da drenagem linfática da genitália. Como descrito anteriormente, a sequência vai dos linfonodos inguinais superficiais, profundos, seguidos pelos linfonodos pélvicos. Não existe possibilidade de acometimento linfonodal pélvico sem o devido acometimento inguinal ipsilateral. (GRAAFLAND, 2010).

Para início do tratamento das prováveis metástases linfonodais, os pacientes com CP devem ser estratificados de acordo com o risco de ocorrência deste acometimento. Dessa forma, existem três cenários possíveis de risco. O primeiro são os pacientes com linfonodos com aspecto normal à palpação, denominados cN-. Em segundo, pacientes com linfonodos inguinais aumentados e suspeitos à palpação, denominados cN+. Em terceiro, pacientes com linfonodos inguinais grosseiramente aumentados ou até ulcerados, também denominados cN3 (HUGHES, 2010).

A conduta nos pacientes cN- é norteada através da subdivisão destes pacientes em grupos de risco: baixo e alto risco para ocorrência de metástases. Essa avaliação é de extrema importância, uma vez que linfonodos inocentes ao exame clínico podem apresentar metástases ocultas em cerca de 25% dos casos. Basicamente as metástases linfonodais dependem de três fatores: estadió do tumor peniano, grau histológico e presença de invasão linfovascular no tumor primário (PHILIPPOU, 2012).

Após classificação de risco determinada, três estratégias de tratamento dos linfonodos são possíveis: vigilância expectante da região inguinal, avaliação linfonodal invasiva ou a linfadenectomia radical (LEIJTE, 2008).

A conduta expectante dos linfonodos regionais nos pacientes cN- deve ser avaliada cuidadosamente. Sempre realizar a correta estratificação de risco destes pacientes. A ocorrência inadvertida de metástases inguinais ocultas contribui para prejuízo significativo na sobrevida. Sabe-se que pacientes tratados com linfadenectomia (LND) inguinal precoce têm evolução mais favorável do que os que se encontram em

observação e evoluem com aparecimento de metástases durante esse período. Um estudo prospectivo comparando linfadenectomia bilateral, radioterapia e vigilância em pacientes cN-; evidenciou melhor sobrevida no braço da linfadenectomia (PIVA, 1996). Dessa forma, pode-se inferir que a LND precoce é a opção mais indicada na categoria de pacientes de alto risco para metástases (KULKARNI, 1994). Até o momento, não há um método diagnóstico eficiente para a avaliação dos linfonodos regionais nos pacientes cN- de alto risco.

Os pacientes cN+ devem ser submetidos à LND imediata devido à alta probabilidade de se tratar de linfonodos metastáticos, ainda que, em até 40% destes pacientes, o aumento linfonodal possa ser resultante de reação inflamatória inespecífica ao tumor primário (ZHU, 2010). Como comentado anteriormente, neste cenário, <sup>18</sup>F-FDG PET/CT vem se mostrando como uma técnica diagnóstica não invasiva cada vez mais eficiente em diferenciar inflamação de metástase (SOUILLAC, 2012).

A LND inguinal é um procedimento cirúrgico com significativa morbidade. Linfedema, necrose do retalho cutâneo, infecção, abscesso, trombose venosa, não são complicações raras. As taxas de complicação variam de acordo com estágio da doença, *status performance* do paciente, obesidade e com experiência da equipe cirúrgica que realiza o procedimento. As séries mais recentes relatam as seguintes taxas de complicação: infecções da ferida (1,2-1,4%), necrose da pele (0,6-4,7%), linfedema (5-13,9%) e formação de linfoceles (2,1-4%) (KOIFMAN, 2013).

Os linfonodos inguinais fixos, bilaterais, ulcerados, categoria cN3, apresentam prognóstico extremamente desfavorável. Faz-se necessário o estadiamento à distância do abdome e tórax. A abordagem deve ser multimodal. A conduta mais indicada é a quimioterapia neoadjuvante para se viabilizar a ressecção das lesões fixas. Esta ressecção deve ser realizada nos pacientes que apresentarem resposta terapêutica à terapia sistêmica. As taxas de sobrevida livre de doença a longo prazo são menores que 40% (LEITJE, 2007).

### **1.1.6- Estadiamento TNM**

Para o estadiamento do tumor, utiliza-se a classificação TNM (*Tumor Nodes Metastasis*), atualizada na 8ª Edição da publicação da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* em 2017 (Anexo I). Esta última publicação apresentou atualizações significativas. Anteriormente, a categoria pTa era aplicada ao antigo carcinoma verrucoso não-invasivo. Porém, atualmente é denominado CCE localizado não-

invasivo. Dessa forma engloba outras categorias de CCE não invasivos, como o basalóide, condilomatoso, papilar e misto (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2017) (AMIN, 2017).

O estadió pT1 também foi revisto. Este incorpora os tumores com invasão das camadas superficiais, porém sem invasão dos corpos cavernosos ou esponjosos. Na classificação atual, incluiu-se a localização anatômica do tumor (prepúcio, glânde ou corpo do pênis), como elemento relevante para a categorização. O pT1 é subdividido em pT1a e pT1b, com riscos relativos de acometimento linfonodal de 10-18% e 33-50%, respectivamente. As invasões perineural e linfovascular (LVI) são reconhecidas como preditores de metástase linfonodal e são critérios de separação dos tumores pT1a e pT1b. A presença de alto grau histológico (grau 3) é também critério diagnóstico de tumor categoria pT1b (PANER, 2018).

Anteriormente, a categoria pT2 era composta por tumores com invasão dos corpos cavernosos e/ou esponjoso. Alguns estudos evidenciaram melhor prognóstico e maior sobrevida quando o tumor acometia apenas o corpo esponjoso (REES, 2008). A presença de metástases em linfonodos inguinais variou entre 33,0-35,8% e 48,6-52,5% nos dois grupos, respectivamente. Assim, atualmente, a categoria pT2 é restrita aos tumores com invasão exclusiva do corpo esponjoso, sendo aqueles com invasão do corpo cavernoso classificados como pT3. A invasão da uretra, previamente classificada como pT3, na classificação atual, pode ser pT2 ou pT3, dependendo da invasão dos corpos esponjosos ou cavernosos e não mais como fator independente. O câncer de pênis próximo ao meato pode invadir diretamente a uretra distal e não estar associado a pior prognóstico (LEITJE, 2008) (PANER, 2018).

A categoria dos linfonodos também foi reavaliada. Na classificação anterior, pacientes com um único linfonodo inguinal eram classificados como pN1, aqueles com mais de dois linfonodos ou com acometimento bilateral, como pN2. Porém, recentes séries clínicas evidenciaram que não havia diferença significativa no risco de morte por CP que justificasse tal classificação. Pacientes com uma ou duas metástases em linfonodos inguinais unilaterais (sem extensão extranodal) comportavam-se de forma semelhante àqueles com único linfonodo positivo. Porém, a lateralidade implicava em evolução desfavorável. A presença de três ou mais linfonodos inguinais acometidos, unilaterais ou bilaterais, é critério de pior prognóstico se compararmos os pacientes com acometimento de um ou dois linfonodos inguinais unilaterais. A sobrevida média em 3 anos nesses dois grupos é de 60,5% e 90,7%, respectivamente (LI, 2015).

Sendo assim, a classificação pN1 hoje é aplicada aos tumores com dois linfonodos unilaterais acometidos, sem extensão extranodal. Tumores com mais de dois linfonodos unilaterais acometidos ou com infiltração em cadeias bilaterais são classificados como pN2. Tal adequação resultou em redução na indicação de quimioterapia adjuvante. O prognóstico dos pacientes com estadiamento pN3 é reservado. Estudos recentes conferem sobrevida média de 3 anos a 28,6% dos pacientes com acometimento dos linfonodos pélvicos, frente aos 47,9% de sobrevida naqueles com acometimento apenas dos linfonodos inguinais, mesmo que haja extensão extranodal (PANER, 2018).

O grau histológico tumoral é um preditor de metástases linfonodais (VELAZQUEZ, 2008). O atual sistema de classificação de três graus (WHO/ISUP) substituiu a antiga classificação de Broders para o CCE (BRODERS, 1921). A classificação da WHO/ISUP considera tumor de grau 3 (G3) aquele que apresentar qualquer grau de anaplasia, mesmo que focal. Não há muita dificuldade para se categorizar os tumores de grau 1 (G1) de acordo com os achados histológicos. O reconhecimento de ambos facilita a categorização do grau 2 (G2). Tumores pT1 de baixo e alto graus são classificados como pT1a de pT1b, respectivamente, com nível de evidência I. O carcinoma sarcomatoide, que é variante histológica agressiva, deve ser considerado tumor de alto grau e classificado como pT1b (PANER, 2018).

## **1.2- <sup>18</sup>F-FDG PET no Câncer de Pênis**

### **1.2.1- PET com <sup>18</sup>F-Fluordeoxiglicose (<sup>18</sup>F-FDG)**

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) é um exame da Medicina Nuclear que utiliza traçadores marcados com radionuclídeos emissores de pósitrons. Esta técnica foi introduzida como método de imagem *in vivo* em meados da década de 80. Desde então, as informações obtidas promoveram inegável avanço na medicina, principalmente no campo da oncologia. Auxilia no diagnóstico, estadiamento, prognóstico e acompanhamento de pacientes oncológicos (ROHREN, 2004).

A PET é uma técnica de imagem médica funcional capaz de prover informações moleculares e/ou metabólicas através da ligação entre radiofármaco e receptor ou da retenção do radiofármaco no compartimento de interesse mediado por uma reação substrato-enzima. O radiofármaco ou radiotraçador é constituído por compostos específicos (anticorpos, ligantes, moléculas químicas, precursores proteicos ou estruturais, etc.) marcados com algum isótopo radioativo emissor de pósitrons (<sup>18</sup>F) que

apresentam um alto grau de seletividade para seu receptor e são geralmente tolerantes a modificações estruturais (TER-POGOSSIAN, 1975) (JACKSON, 2017).

Radionuclídeos emissores de pósitrons são mais comumente produzidos em cíclotrons por meio do bombardeio a elementos estáveis com prótons, deutérios ou núcleos de hélio. Os radionuclídeos produzidos possuem um excesso de prótons e decaem por emissão de pósitrons. Quando um pósitron é emitido do núcleo, ele percorre uma curta distância do seu sítio de origem, perdendo energia gradativamente para o meio em que se movimenta (tecidos, ar, etc.). No momento em que a maioria de sua energia cinética é perdida, o pósitron interage com um elétron livre, ocasionando uma reação de aniquilação. Essa reação gera dois fótons gama de 511 KeV que são emitidos em direções opostas de aproximadamente 180° um do outro (DELBEKE, 2006).

Em um aparelho PET, os fótons emitidos do paciente interagem com um detector sólido que definem uma linha ao longo da qual a reação de aniquilação ocorreu permitindo sua localização. Dessa maneira, utilizando-se de muitos eventos, a imagem da PET pode ser reconstruída e posteriormente fusionada com imagens anatômicas da TC e/ou da RM (ROHREN, 2004).

A manutenção da vida e do crescimento celular gira em torno do metabolismo da glicose, o nutriente central celular, que permite que seja gerada energia e esta aproveitada na forma de ATP através da oxidação de suas ligações de carbono. O produto dessa reação pode ser lactato ou, após oxidação completa da glicose via respiração na mitocôndria, o CO<sub>2</sub>. Este processo é essencial para sustentar toda a vida dos mamíferos (KOPPENOL, 2011).

A fluorodesoxiglicose (FDG), um análogo da glicose, marcada com o Flúor-18 (<sup>18</sup>F) (<sup>18</sup>F-FDG), é o radiofármaco mais comumente utilizado nas imagens clínicas da PET. A sua enorme aplicabilidade em oncologia como traçador tumoral é justificada pelo efeito *Warburg* observado nas células malignas. No início da década de 1920, o pesquisador Otto Warburg observou que os tumores consumiam enormes quantidades de glicose em comparação aos tecidos normais ao seu redor (WARBURG, 1927). Seguindo seus estudos e propondo uma teoria inédita para a época, Otto Warburg descreveu que, nas células tumorais, a conversão de glicose em ácido láctico, mesmo na presença de oxigênio, era possível. Essa teoria é conhecida como glicólise aeróbica ou efeito *Warburg*. Em 1956 essa teoria foi publicada, reconhecida e denominada como a causa primária do câncer (WARBURG, 1956).

O fenótipo do efeito *Warburg* é somente observado em cânceres e, especialmente, em cânceres humanos. Além disso, é considerado um mecanismo de adaptação que confere necessidades biológicas específicas, como o consumo elevado de glicose, gerando a proliferação aumentada. No entanto, as anormalidades metabólicas relacionadas aos tumores não se limitam à alteração do equilíbrio entre a fermentação de glicose e a fosforilação oxidativa. Genes tumorais chave, tais como *p53* e *c-MYC*, estão sendo designados como mestres reguladores do metabolismo; além de mutações em enzimas metabólicas como a isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), piruvato quinase 2 (PKM2), fumarato hidratase (FH) e succinato desidrogenase (SDH). Sendo assim, o estado metabólico alterado, efeito *Warburg* e fatores moleculares promovem a proliferação celular extremamente rápida e o crescimento do tumor (LIBERTI, 2016).

Além do efeito *Warburg*, a maioria das células tumorais, diferente das células normais, usam grandes quantidades de glicose como fonte de energia por apresentarem um importante aumento na expressão dos transportadores de glicose (especialmente GLUT-1). GLUT-1 superexpresso não ocorre na maioria dos tecidos normais. Diversos estudos analisando antígenos anti-GLUT-1, detectam ocorrência aumentada destes transportadores em tecidos neoplásicos. Por conseguinte, esse fenômeno concede maior capacidade diagnóstica ao PET com uso  $^{18}\text{F}$ -FDG no diagnóstico dos tumores malignos. Uma vez que a incorporação do  $^{18}\text{F}$ -FDG também é aumentada (DE GEUS-OEI, 2007) (LUNT, 2011).

Após o transporte da glicose e da  $^{18}\text{F}$ -FDG para o meio intracelular, inicia-se o processo de fosforilação realizado pelas hexoquinases. A Hexoquinase-II (HK-II) é a mais frequente em tecidos com elevado consumo glicêmico e em neoplasias. Característica que confere à HK-II papel de marcador de aumento do consumo glicêmico em tumores malignos. O  $^{18}\text{F}$ -FDG fosforilado ( $^{18}\text{F}$ -FDG-6-P), diferente da glicose, não é rapidamente eliminado. Este fica retido no citoplasma celular e sua concentração é diretamente proporcional ao consumo celular de glicose (DELBEKE, 2006) (TONG, 2012).

Embora o  $^{18}\text{F}$ -FDG atinja um platô de concentração em tumores malignos em cerca de 45 minutos, a melhor relação tumor-radiação de fundo ocorre entre uma a três horas após a administração endovenosa. Concentrações fisiológicas do radiofármaco pelo organismo, denominadas biodistribuição, são encontradas em órgãos e tecidos que apresentam elevado metabolismo de glicose (cérebro, coração, músculos, trato gastrointestinal) e nas vias de excreção (sistema urinário) (KOSTAKOGLU, 2004).

A PET pode detectar anormalidades funcionais antes mesmo de se tornarem morfológicamente evidentes nas imagens convencionais (exemplo: TC). Isto permite que ele seja útil na detecção de células tumorais viáveis após tratamento, diferenciando-as de fibrose e/ou de edema. Com o advento da PET, a avaliação de tumores, historicamente realizada por métodos de imagem morfológicas como a TC, passou a se basear em dados moleculares metabólicos (AMBROSINI, 2012).

Com o avanço tecnológico, um equipamento híbrido pode adquirir dados da PET e TC (PET/CT) sequencialmente na mesma mesa, reduzindo erros de fusão e movimentação do paciente, gerados quando os exames são adquiridos em momentos distintos. A constatação de seus excelentes resultados de acurácia e efetividade clínica permitiram sua rápida disseminação (KAPOOR, 2004). Atualmente, existem equipamentos híbridos que utilizam os dados fornecidos pela PET associados às imagens da Ressonância Magnética (RM) (PET/RM). Séries comparando os resultados de ambas as técnicas evidenciaram que os valores de captação da PET e seu poder diagnóstico são similares, independentemente do tipo de imagem utilizada (PARTOVI, 2014).

No Brasil, os equipamentos de PET/CT foram gradativamente incorporados ao arsenal diagnóstico a partir de 2003. Recentemente, notou-se um avanço crescente no número de equipamentos instalados em instituições públicas e privadas, associado a um número também crescente de instalações de ciclotrons (equipamentos que produzem os isótopos emissores de pósitrons utilizados na realização dos exames). Os ciclotrons existentes no Brasil estão localizados em diferentes regiões do país, o que possibilita a descentralização da realização dos exames de PET/CT. Para a realidade de saúde pública, onde a maioria dos pacientes com CP serão atendidos, cerca de 75% da população em geral, os custos dos exames de PET/CT ainda são elevados e preocupantes. É um fato alarmante, uma vez que a crescente aplicabilidade dos exames é indiscutível, elevando as evidências das indicações cada vez mais consistentes ao uso da PET em oncologia (CAETANO, 2014).

A avaliação dos resultados do PET/CT é feita através da análise semiquantitativa utilizando o valor máximo de captação padronizado (*standardized uptake value*) ( $SUV_{max}$ ) em um voxel de imagem normalizado para o peso corporal do paciente (NABI, 2002). Além disso pode-se utilizar a análise volumétrica, gerada usando um algoritmo de segmentação tumoral previamente validado em pacientes com câncer de esôfago e reto (MAMEDE, 2007a). Este método usa um valor de limiar ajustável para

gerar os volumes de imagens PET do voxel com captação máxima de  $^{18}\text{F}$ -FDG no tumor ( $T_{\text{max}}$ ). Resumidamente, a região de interesse (ROI) compreendendo todo o fígado em uma fatia transaxial foi desenhada e a média e o desvio padrão (SD) do valor de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG ( $L_{\text{mean}}$  e  $L_{\text{SD}}$ , respectivamente) são calculados. Para individualizar o limiar de segmentação tumoral, um valor menor de SUV tumoral ( $T_{2\text{SD}}$ ) é gerado a partir da seguinte fórmula:  $T_{2\text{SD}} = T_{\text{max}} - (L_{\text{mean}} + 2 \times L_{\text{SD}})$ . Essa metodologia gera volumes nas imagens PET da lesão alvo ( $\text{Vol}_{2\text{SD}}$ ) e o SUV médio no volume ( $\text{SUV}_{2\text{SD}}$ ) (MAMEDE, 2007a)

### 1.2.2- $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT no Câncer de Pênis

O uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT na avaliação do câncer de pênis é recente. Alguns fatores podem contribuir para esse histórico: PET/CT é uma tecnologia moderna, de custo elevado e a baixa prevalência global do CP. O primeiro registro na literatura do uso desta tecnologia no CP data de 2001. Trata-se somente de um relato de caso, onde a PET/CT foi utilizada para avaliação pré-operatória. Os autores relataram extensa área de captação na hemipelve esquerda caracterizando provável acometimento linfonodal (RAVIZZINI, 2001).

O CCE peniano é um tumor de intensa replicação celular e consequente elevado metabolismo, resultando em grande consumo glicêmico. Isto faz com que o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT tenha importante potencial de avaliação nesta neoplasia. A presença de processo inflamatório acentuado, comum nos CCE, aumenta o risco da ocorrência de falsos positivos e deve ser levado em consideração na avaliação dos exames. Se extrapolarmos para outros carcinomas epidermóides, em localizações diferentes, o uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT já é estabelecido e com resultados consistentes. Nos tumores de esôfago, a PET apresenta resultados positivos na avaliação do prognóstico e resposta terapêutica ao tratamento quimioterápico. (MAMEDE, 2007b, FAGUNDES, 2018).

Como visto anteriormente, o principal fator prognóstico no CP é o acometimento metastático linfonodal. Dessa forma, desde as primeiras séries, o uso da PET no CP objetivou essa avaliação. O primeiro resultado mais consistente sobre o uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT no CP avaliou 30 pacientes. Os autores concluíram que a PET/CT era uma ferramenta com grande potencial para a avaliação dos linfonodos inguinais, inclusive no planejamento cirúrgico. O uso para avaliação do tumor primário era limitado e não havia indicação (SCHER, 2005).

Séries recentes, inclusive com estudos prospectivos, demonstraram resultados

promissores na utilização dessa ferramenta diagnóstica, com sensibilidade e especificidade importantes na detecção de acometimento tumoral nos linfonodos clinicamente positivos. Entretanto, um fator comum nesses trabalhos é a baixa acurácia nos pacientes cN-. Infelizmente, neste grupo de pacientes, a PET/CT não se mostrou eficiente na detecção de micrometástases, o que seria importante para se evitar cirurgias desnecessárias. Com o aumento do número de pacientes avaliados, estima-se que a acurácia venha aumentar, mesmo nos pacientes cN-. A associação da PET/CT com a pesquisa de linfonodo sentinela aumentou a acurácia. O procedimento combinado obteve uma sensibilidade de 94%, reduzindo a taxa de falsos negativos para um nível aceitável. (SCHLENKER, 2012) (JAKOBSEN, 2016).

Recentemente, em uma revisão acerca do uso da PET/CT no CP, os autores avaliaram os diversos estudos já publicados até 2017. Observou-se que o número de estudos é limitado e que existe uma grande variação na metodologia utilizada entre eles. A sensibilidade da PET/CT na detecção de metástases linfonodais variou consideravelmente. Em regiões inguinais normais, estima-se uma sensibilidade de 57%, enquanto em pacientes com linfonodos palpáveis a sensibilidade chegou a 96% (OTTENHOF, 2017).

Em outra recente série, 55 pacientes portadores de CP foram submetidos ao  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT, objetivando-se a avaliação do prognóstico. A análise foi feita através da avaliação quantitativa dos valores de SUV para determinação de pontos de corte. Utilizando esta metodologia, os resultados da PET/CT foram preditores de desfecho clínico e oncológico. A análise de regressão logística multivariada evidenciou dois cenários: óbito câncer específico e ocorrência de metástase linfonodal inguinal.  $p\text{SUV}_{\text{max}}=16,6$  ( $\text{SUV}_{\text{max}}$  da lesão peniana) e  $n\text{SUV}_{\text{max}}=6,5$  ( $\text{SUV}_{\text{max}}$  linfonodal) foram, respectivamente, os pontos de corte para os achados anteriores. Estes resultados corroboram o uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT como uma ferramenta prognóstica para CP (SALAZAR, 2018).

Como observado, o uso do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT para avaliação das neoplasias penianas tem se mostrado cada vez mais consistente, com maior número de trabalhos e com perspectiva de utilização diagnóstica e prognóstica. Mesmo assim, os resultados ainda podem ser ambíguos, conflitantes e carecem de melhora na acurácia. Em outros tumores, a avaliação de potenciais marcadores moleculares tumorais relacionados ao metabolismo glicêmico e à proliferação tem se mostrado como uma forma de tornar os resultados prognósticos da PET/CT com  $^{18}\text{F}$ -FDG mais precisos. No contexto do CP,

esta associação ainda não foi realizada. Acredita-se que essa análise possa elevar a capacidade de diagnóstico e prognóstico e, sem dúvidas, uma melhora na qualidade dos resultados.

### **1.3- Os Marcadores Tumorais**

#### **1.3.1- GLUT-1**

Os transportadores de soluto transmembrana são proteínas integrais que transportam nutrientes, íons ou outros metabólitos através das membranas celulares ou membranas de organelas. A família dos transportadores de soluto é composta por mais de 400 membros. Dentro desta superfamília, encontram-se os facilitadores do transporte de glicose ou GLUT's (ANCEY,2018).

Estes transportadores determinam o fluxo de entrada de açúcar entre os ambientes extra e intracelular (KIM, 2006). A família dos transportadores GLUT, por sua vez, é composta por 14 membros e sua distribuição nos tecidos revela uma expressão de GLUT dependente do tipo de órgão e função. Dessa forma, o tecido cerebral, que tem grande dependência da glicose para suportar as demandas metabólicas, expressa principalmente dois transportadores de glicose de alta afinidade: GLUT-1 e GLUT-3 (LEINO, 1997).

Nos últimos anos, diversos estudos identificaram GLUT-1 e GLUT-3 como os principais atores do metabolismo acelerado. Embora o metabolismo da glicose tenha sido objeto de intensas investigações, a captação e os mecanismos subjacentes da regulação e função do GLUT permanecem menos conhecidos (LUNT, 2011).

Em relação ao estudo do câncer, existem evidências da expressão aumentada de transportadores GLUT em diferentes neoplasias. A superexpressão de GLUT-1 em células neoplásicas, revelada pela imuno-histoquímica, foi a primeiramente estudada. Sua maior presença indica aumento da atividade proliferativa, elevada demanda energética e comportamento agressivo tumoral (CANTUÁRIA, 2001).

No carcinoma hepatocelular, estudos identificaram a expressão de GLUT-2 mais elevada. Sendo que este achado se correlacionou com pior sobrevida global (KIM, 2017). Já nos tumores gênito urinários, no câncer de bexiga, o GLUT-3 está aumentado em tumores músculo-invasivos em comparação com tumores não invasivos, conferindo, dessa forma, uma correlação de pior prognóstico neste cenário (HAN, 2017). Em geral, a alta expressão de GLUT-1 na maioria dos tipos de câncer examinados, está associada

a uma pior sobrevida, incluindo carcinoma colorretal, carcinoma de mama, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células escamosas, carcinoma ovariano (CHAI, 2017).

Estudos moleculares com uso de análise imuno-histoquímica sugerem que a super-expressão da GLUT pode conferir vantagem adaptativa de sobrevivência às células tumorais em ambientes de baixa concentração de glicose, tornando os tumores resistentes. Em uma série avaliando respostas de pacientes com glioblastomas à quimioterapia com bevacizumabe, um inibidor do VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), amostras tumorais foram analisadas para maior expressão de GLUT. Após o tratamento antiangiogênico, para prosperar no microambiente desvascularizado, é necessário que haja a adaptação da célula tumoral. Isto principalmente em relação à presença diminuída da glicose. Neste ensaio clínico, observou-se 50% menos glicose disponível nas amostras tratadas com bevacizumabe. Comparando as células responsivas ao tratamento quimioterápico versus as quimio-resistentes, observou-se aumento da captação de glicose nas últimas. Isto foi associado à superexpressão de GLUT. O GLUT foi regulado positivamente em tumores resistentes ao bevacizumabe permitindo resistência maior ao ambiente com menor disponibilidade de glicose. Direcionar ações terapêuticas à GLUT, em tumores resistentes, poderia ser uma via de tratamento tumoral futura (KUANG, 2017) (FLAVAHAN, 2013).

Como o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT é capaz de avaliar a atividade metabólica tumoral, há uma relação direta entre o consumo aumentado de glicose das células neoplásicas e uma super-expressão de transportadores de glicose (ZHU, 2011). A correlação positiva entre a expressão de GLUT-1 com os resultados do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT foi de fato demonstrada no câncer cervical (YEN, 2014) e no linfoma gástrico primário (WATANABE, 2013).

A associação entre os resultados da  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT com marcadores biológicos, como a expressão do GLUT, já vem sendo utilizado como fator de prognóstico desfavorável e preditor de agressividade tumoral. Este resultado é de extrema importância e permite avaliar a necessidade de tratamentos mais invasivos e até adjuvância no tratamento do câncer. Este conceito foi descrito em relação ao câncer de mama (KIM, 2017) (KAIDA, 2018).

Em relação ao CP, existe somente um relato na literatura acerca da avaliação da expressão da GLUT nos tumores penianos. Os autores avaliaram amostras tumorais de 18 pacientes com CP. Concluíram que os tumores infiltrativos expressavam mais o GLUT-1 (MORIYAMA, 1997).

Não existem relatos de avaliações acerca da expressão de GLUT, nos tumores penianos, associados ao  $^{18}\text{F}$ FDG PET/CT.

### 1.3.2- Hexoquinase-II

A hexoquinase, também denominada Hexocinase ou HK, é uma enzima com a função de fosforilar a glicose para produzir glicose-6-fosfato (G6P), o primeiro passo na maioria das vias de metabolismo glicolítico (WILSON, 2003). Existem quatro formas de HK conhecidas, HK1a HK4. A maioria dos tecidos em adultos expressa apenas HK-I. Os tecidos musculares e o adiposo utilizam a HK-II para glicólise. Em contraste com os tecidos normais, muitos cânceres expressam HK-I e HK-II. A atividade elevada de hexoquinase como um fator facilitador da glicólise tumoral foi relatada no final dos anos 70 (BUSTAMANTE, 1977). Somente três décadas após, a expressão específica de HK-II foi identificada na maioria dos tumores (MATHUPALA, 2006).

Como já descrito anteriormente, sabe-se que as células cancerígenas têm taxas aumentadas de metabolismo da glicose em comparação com as células saudáveis (WEBER, 1977). Diversos mecanismos são aventados para o uso acelerado da glicose observado em tumores em crescimento e em células transformadas e malignas. O transporte transmembrana mediado por elementos específicos como o GLUT é considerado um dos mecanismos mais importantes para aumentar o influxo de glicose nas células. Além do transporte intra-celular de açúcar, foram relatadas, nos tecidos tumorais, concentrações aumentadas de hexoquinase para acelerar a fosforilação da glicose, o que resulta em aumento do consumo de glicose (MERRALL, 1993). Ao catalisar a fosforilação da glicose em G6P, a hexoquinase promove e sustenta um gradiente de concentração que facilita a entrada de glicose nas células e o início de todas as vias principais de utilização de glicose. Consequentemente, influenciam tanto a magnitude como a direção do fluxo de glucose dentro do meio intracelular (WILSON, 2003).

Como as células cancerígenas expressam níveis elevados e específicos de HK-II, esta atividade aumentada nos cânceres pode ser avaliada através da utilização do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT. O  $^{18}\text{F}$ -FDG é um análogo da glicose que é também transportado pelo GLUT para o meio intracelular. Ao entrar no compartimento intracelular, o  $^{18}\text{F}$ -FDG é rapidamente fosforilado pela HK-II formando  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-fosfato ( $^{18}\text{F}$ -FDG6P) que pode ser detectado pela PET. Devido às diferenças estruturais do  $^{18}\text{F}$ -FDG6P em relação ao G6P, o  $^{18}\text{F}$ -FDG6P não é mais metabolizado e, portanto, é aprisionado no meio

intracelular. O aumento do acúmulo de  $^{18}\text{F}$ -FDG6P nas células malignas está associado a aumentos expressivos nas taxas relativas de captação e a uma maior sensibilidade da PET/CT para a detecção dos cânceres (ZHAO,2013).

A detecção isolada do  $^{18}\text{F}$ -FDG pelo PET/CT para diferenciação dos tecidos tumorais pode ter sua acurácia diminuída por respostas falso positivas, principalmente em áreas de inflamação, que também captam mimetizando uma lesão maligna. Existem evidências, em diferentes tumores, que utilizaram os resultados do PET/CT associados à detecção da superexpressão da HK-II nos tecidos através de imuno-histoquímica. Esta associação demonstrou um aumento na positividade destes exames em células cancerosas (MAMEDE, 2005).

Dada a sua ocorrência aumentada em células cancerosas e quase exclusivamente nestes tecidos em humanos adultos normais, a HK-II se constitui em um potencial alvo seletivo para o tratamento tumoral. Até o momento, não existem terapias direcionadas para intervenção no metabolismo glicolítico. Entretanto, o estudo da expressão da HK-II nos cânceres é de extrema importância e potencial de descoberta de tratamentos futuros (SHILI, 2018).

Não existem evidências acerca do estudo da expressão da HK-II, isolado ou em associação com o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT no cenário do CP.

### **1.3.3- Ki-67**

O Ki-67 (ou PCNA) é uma proteína nuclear não-histona ligada à replicação do DNA. Apresenta peso molecular de 36kDa e tem papel na iniciação da proliferação e crescimento celular por aumento da enzima DNA polimerase. A fração da fase de síntese das células tumorais (fase S) correlaciona-se com o prognóstico dos tumores e pode ser medida pela determinação de antígenos nucleares associados à proliferação celular, como a Ki-67. A taxa rápida de proliferação celular tem correlação com o aumento da agressividade dos tumores (HANAHAN, 2011).

O Ki-67 é utilizado como marcador para estudo do potencial proliferativo. Pode ser avaliado em amostras tumorais através de IHQ, sendo que células positivas indicam prognóstico adverso devido à maior agressividade do tumor e seu maior potencial de crescimento local. Altas taxas de proliferação celular são associadas a um menor tempo de sobrevida livre de doença, este potencial prognóstico já é muito bem estabelecido no câncer de mama (DOWSETT, 2011).

Em uma coorte de 2.653 pacientes com tumores de mama, os autores confirmaram o ponto de corte de 14% de positividade do Ki-67 como fator prognóstico independente. Os resultados vieram confirmar a relevância da positividade deste marcador como sub-classificação do tipo tumoral para determinação do prognóstico no câncer de mama (HEALEY, 2017). A positividade do marcador PCNA é também corroborada como indicativo para resposta terapêutica. Em pacientes com câncer de mama agressivos, a presença de Ki-67 positivo representa fator determinante da resposta terapêutica naqueles tratados com quimioterapia neoadjuvante (GUESTINI, 2018). Nos tumores penianos existe correlação positiva entre a positividade do marcador Ki-67 e maior disseminação metastática e pior prognóstico (PROTZEL, 2007).

Como o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT tem a capacidade de detectar tecido neoplásico, através do aumento do metabolismo glicolítico como consequência da elevação da proliferação celular, é racional que os seus resultados sejam correlacionados aos da proteína Ki-67. Os mais recentes estudos acerca desta correlação foram controversos, o que sugere necessidade de maiores análises e em distintos tecidos para resultados confiáveis. Em relação aos tumores de mama, a captação elevada do  $\text{SUV}_{\text{max}}$  do tumor correlaciona com lesões com elevada taxa de proliferação e consequente pior prognóstico. Porém, esses resultados se correlacionaram de maneira diferente com os achados positivos para o Ki-67 (NISHIMUKAI, 2017). Em uma série acerca da avaliação da significância do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT na avaliação prognóstica dos cânceres de ovário, os autores concluíram que o  $\text{SUV}_{\text{max}}$  era um fator preditor de proliferação e resposta à quimioterapia. Valores aumentados do  $\text{SUV}_{\text{max}}$  se correlacionavam com o índice de positividade do Ki-67 pela IHQ (SHUAI, 2018).

Não existem estudos, até o momento, de correlação da expressão da Ki-67 em associação com o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT no cenário do CP.

### 1.3.4- p16

A p16, também denominada  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$  é uma proteína supressora de tumor inibidora de quinase dependentes de ciclina. Representa uma das ligações mais diretas entre o controle do ciclo celular e as neoplasias. O gene  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$  é frequentemente inativado em tumores humanos, sendo que esta mutação resulta em suscetibilidade a vários tipos de câncer. Semelhante ao CCE a via supressora do retinoblastoma (Rb) também é alterada pela proteína E7 do HPV de alto risco. A p16 inibe as cinases

dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4/6) que fosforilam a proteína Rb. O acúmulo de Rb hipofosforilado sinaliza a parada do ciclo celular impedindo a reprodução tumoral (SANAELI, 2020).

Embora o p16 seja um supressor tumoral em tecidos normais, nos carcinomas espinocelulares a inibição de p16 tem atividade oncogênica estimulando a CDK4/6 (MUGER, 2013). Assim, o acúmulo de p16 detectado por imuno-histoquímica sugere infecção por HPV de alto risco. Nos pacientes com tumores penianos a detecção do p16 se relaciona a tumores associados à infecção por HPV (ZITO, 2021).

Existe uma tendência em considerar o status p16 como um preditor independente de sobrevida no CP. Os tumores p16 positivos têm um prognóstico significativamente melhor em comparação com os tumores negativos (MONHANTY, 2021).

Não existem evidências acerca de estudos, até o momento, de correlação da expressão da p16 em associação com o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT no cenário do CP.

### **1.3.5- p53**

As células são constantemente estimuladas por uma variedade de estresses endógenos e ambientais que resultam em danos celulares que serão prejudiciais se replicados. Em condições normais, isso leva à parada do ciclo celular permitindo que o dano seja reparado. No entanto, em uma ocasião de dano grave, é necessário ativar diretamente o programa de apoptose celular, impedindo o início de processos oncogênicos. A p53 é a principal proteína relacionada a esse processo e, dessa forma, considerada uma supressora tumoral. Ela controla diretamente a replicação do DNA e a divisão celular descontrolada durante o crescimento neoplásico (LEVINE, 2009).

Em relação aos tumores penianos, semelhante ao mecanismo da p16, a infecção pelo oncovírus HPV também relaciona-se diretamente à atuação da p53 no CP. A oncoproteína E6 do HPV inativa a p53, e essa inativação resulta na progressão do câncer de pênis (MARTINS, 2002).

As evidências acerca da correlação dos resultados do PET/CT com expressão do p53 são conflitantes. Recente revisão sistemática sobre avaliação de tumores pulmonares concluiu que o SUV não pode ser avaliado como um potencial marcador de expressão de p53 (SUROV, 2018).

Não existem estudos, até o momento, de correlação da expressão da p53 em associação com o  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT no cenário do CP.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Principal**

Avaliar a correlação das expressões dos marcadores tumorais GLUT-1, HK-II, Ki-67, p16 e p53 com os resultados do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT nos pacientes com câncer de pênis.

### **2.2- Secundários**

Correlacionar os achados histopatológicos e a presença do HPV no câncer de pênis de pacientes avaliados com a imagem molecular do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT e com os marcadores tumorais GLUT-1, HK-II, Ki-67, p16 e p53.

### 3- ESTRUTURA DO ARTIGO

O presente projeto iniciou-se em 2012, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP - UFMG), com o número do parecer: 179.121 (ANEXO II), cumprindo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP. Todos os participantes consentiram por escrito em participar desse estudo de forma livre e consciente, preservando a voluntariedade da participação e o respeito à dignidade e decisão de cada sujeito da pesquisa. [11]  
[5EP]

#### **Expressões de GLUT-1, Hexoquinase-II, Ki-67, p53, p16 e HPV com <sup>18</sup>F-FDG PET/CT no Câncer de Pênis**

### 3.1- INTRODUÇÃO

O câncer de pênis (CP) é um tumor raro em países desenvolvidos (DOUGLAWI, 2019). Na América do Sul, o nordeste brasileiro, apresenta a maior incidência global dessa neoplasia (VIEIRA, 2020). O CP está associado à inflamação crônica. O Papiloma Vírus Humano (HPV) é encontrado em cerca de metade dos tumores, sugerindo sua ação oncogênica (HAKENBERG, 2018). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma espinocelular (CEC) tipo usual, o prognóstico varia com o tipo tumoral e grau histológico (SANCHEZ, 2020).

Uma ferramenta essencial para avaliação de tumores malignos é a tomografia por emissão de pósitrons (PET), que utiliza marcadores sinalizados com radionuclídeos emissores de pósitrons (ROHREN, 2004). Fluorodesoxiglicose (FDG), um análogo da glicose marcado com Flúor-18 (<sup>18</sup>F) (<sup>18</sup>F-FDG), é o radiofármaco mais amplamente utilizado, e sua aplicabilidade em oncologia como um traçador de tumores se baseia no fato de que as células tumorais exibem maior metabolismo de glicose do que a do meio externo (JACKSON, 2017). Na avaliação do CP, o PET/CT tem se estabelecido como uma ferramenta promissora de avaliação do estadiamento (VRIES, 2019).

Com intuito de se otimizar o aumento da necessidade de glicose, a maioria das células cancerosas superexpressa os transportadores transmembrana de glicose (GLUT), especialmente GLUT1 (ANCEY, 2018). A análise imuno-histoquímica (IHQ) sugere que a superexpressão de GLUT pode fornecer uma vantagem de sobrevivência adaptativa para células neoplásicas em ambientes com baixo teor de glicose (MAMEDE, 2005).

A concentração intracelular de <sup>18</sup>F-FDG depende basicamente da velocidade de

transporte através da membrana celular e da atividade da hexoquinase (GOLSHANI-HEBRONI, 1997). Após o transporte intracelular, a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase tipo II (HK-II) em glicose-6-fosfato (G6P) (WILSON, 2003). No que diz respeito ao metabolismo do  $^{18}\text{F}$ -FDG, acredita-se que o processo de desfosforilação seja desprezível, e o  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-P fica retido no interior da célula, não sendo transportado para fora nem submetido à degradação glicolítica (HABERKORN, 1994). A expressão aumentada de HK-II foi identificada em alguns cânceres, e existe uma correlação positiva entre sua superexpressão com maior captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG (MATHUPALA, 2006).

Ki-67 (ou PCNA) é uma proteína nuclear não histona ligada à replicação do DNA (GERDES, 1984). Foi demonstrado que o antígeno nuclear Ki-67 é expresso em certas fases do ciclo celular (fases S, G1, G2 e M), mas não é expresso em G0, conferindo substancial potencial como marcador de proliferação tumoral (SCHOLZEN, 2000). Em pacientes com CP, existe uma relação positiva entre a expressão de Ki-67 e maior disseminação metastática e consequente pior prognóstico (PROTZEL, 2007). Maior captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG detectado através do PET/CT correlacionou-se com maior positividade de Ki-67 em câncer de pulmão (BU, 2022).

Os tecidos escamosos do pênis são sítios de infecção pelo HPV, e os subtipos de HPV de alto risco expressam as oncoproteínas E6 e E7 relacionadas às vias carcinogênicas (HUANG, 2021). p16INK4 (p16) é uma proteína supressora de tumor da família INK4 de inibidores de quinase dependentes de ciclina. Semelhante ao CEC, a via supressora do retinoblastoma (Rb) também é alterada pela proteína E7 de alto risco do HPV. P16 inibe as cinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4/6) que fosforila a proteína Rb. O acúmulo de Rb hipofosforilado sinaliza a parada do ciclo celular (SANAELI, 2020). Em células tumorais contaminadas por HPV, a proteína E7 desencadeia p16 que causa parada do ciclo celular e senescência (O'NEIL, 2006). A degradação do proteossoma de Rb ocorre. Esta ação de p16 na ausência de Rb devido à interferência de E7 causa superexpressão de p16INK4. Embora o p16 seja um supressor tumoral em tecidos normais, os CCE têm atividade oncogênica por inibir CDK4/6 (MUNGER, 2013). Assim, o acúmulo de p16 detectado por imuno-histoquímica sugere infecção por HPV de alto risco associada ao câncer de pênis (ZITO, 2021).

p53 é uma proteína supressora de tumor que controla a replicação do DNA e a divisão celular descontrolada durante o crescimento tumoral (LUO, 2027). A oncoproteína E6 do HPV inativa a p53, e essa inativação resulta na progressão do

câncer de pênis e caracteriza um critério de pior prognóstico (MARTINS, 2002).

O presente estudo avaliou a positividade imuno-histoquímica de marcadores moleculares tumorais relacionados ao metabolismo da glicose, proliferação tumoral e infecção por HPV e suas relações com a captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG em pacientes com câncer de pênis.

## **3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 - Indivíduos do Estudo**

Trata-se de um estudo retrospectivo e consecutivo, representando um recorte de um estudo prospectivo anterior (SALAZAR, 2019). Onde 55 pacientes foram selecionados no período de outubro de 2012 a outubro de 2014. Os critérios de seleção foram pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular (CEC) de pênis que se submeteram ao estudo de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT para estadiamento. Dentre eles, 2 foram excluídos devido a glicemia elevada (exceder o valor limite superior para  $^{18}\text{F}$ -FDG PET -  $>190\text{mg/dL}$ ) e 2 devido a característica histopatológica (in situ). Assim, 51 pacientes do sexo masculino (mediana da idade 56 anos – Min 26; Max 84; Q1 46,5; Q3 67; IQR 20,5 anos) foram incluídos para posterior análise.

### **3.2.2 - Análise Histopatológica**

Dois patologistas com experiência em uropatologia revisaram biópsias penianas e amostras de penectomia, e um diagnóstico de consenso foi alcançado com base nas diretrizes da WHO-2016 e da Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP). Em caso de discordância, um terceiro patologista, Prof. Antonio Cubilla, analisou os resultados e determinou o diagnóstico final.

### **3.2.3 - Protocolos *Tissue Macro Array* (TMA) e Imuno-histoquímica (IHQ)**

As lâminas de todos os casos foram digitalizadas usando o sistema de imagem automatizado (Panoramic MIDI - 3DHISTECH®, Hungria) e mapeadas para áreas do câncer. Uma ou mais amostras de tumor foram selecionadas nos blocos originais e realizadas perfurações de *cores* de 5,0 mm e transferidas para um bloco receptor. Controles internos (fragmentos de células HeLa, carcinoma hepatocelular e casos positivos de HPV previamente conhecidos) foram colocados em mapas de blocos pré-estabelecidos. Um banco de dados foi construído para cada bloco, incluindo caso de

origem. A TMA final incluiu 6 blocos.

Um corte histológico de 3-5  $\mu\text{m}$  de cada bloco do TMA foi corada para Hematoxilina-Eosina. Mais cinco cortes consecutivos foram coletadas para análise imuno-histoquímica para anti-Glut-1 (EPR3915, 1:100, Abcam), anti-Hexoquinase-II (EPR20839, 1:100, Abcam), anti-Ki67 (1:100, Abcam), anti-p16 (CDKN2A/p16INK4a, 1:200, Abcam) e anti-p53 (E26, 1:100, Abcam). Dois patologistas realizaram a análise de forma independente, ambos experientes em IHQ e cegos para pSUVs e resultados patológicos. Para avaliar a expressão dos antígenos testados, alguns protocolos foram estabelecidos de acordo com dados da literatura prévia.

Para p16, utilizamos os critérios propostos por Chaux et al. e Cubilla et al.; através de padrões de expressão (CHAUX, 2010) (CUBILLA, 2011). Chaux et al. estudaram a marcação para P16<sup>INK4a</sup> em 141 PeIN, classificadas segundo a nomenclatura apresentada à época (2010). Cubilla et al. estudaram a marcação para p16<sup>INK4a</sup> em 202 carcinomas invasores de pênis, classificados de acordo com os critérios apresentados no Atlas Patologia dos Tumores (2011) nos tipos usual, basalóide, condilomatoso, papilífero, verrucoso, dentre outros, incluindo-se tumores mistos. Utilizaram critérios de hiperreatividade semelhantes aos descritos por Chaux et al., considerando-se o padrão 3 como positividade nuclear ou citoplasmática em todas as células neoplásicas, exceto em células paraceratóticas ou na camada córnea, quando presentes.

Para p53, a ideia do uso de um sistema de classificação nas análises de marcação, a exemplo do que foi desenvolvido para a análise do p16INK4a, é muito semelhante à utilizada por Gunia et al. (GUNIA, 2012). A classificação é fundamentada em praticidade, maior reprodutibilidade e menor subjetividade. As análises de marcação levaram em consideração, além da presença ou ausência de positividade, a espessura do epitélio acometido, a porcentagem de células marcadas, notando se a marcação se dava em células contíguas ou de forma descontínua e se era homogênea, com todas as células fortemente coradas (positividade citoplasmática ou nuclear).

O Ki67, como já mencionado, é uma proteína da matriz nuclear não-histona, expressa ao longo de todo o ciclo celular, exceto na fase G0. O índice de proliferação celular, caracterizado pela porcentagem de expressão da proteína nas células neoplásicas, avaliado pela contagem de núcleos positivos em 500 a 1000 mil células, no maior aumento do microscópio (objetiva de 40x), esse método de análise foi utilizado como marcador prognóstico em vários estudos (GENTILE, 2006).

A expressão de GLUT-1 foi avaliada de forma individualizada nas PeIN e nos tumores verruciformes e invasores, utilizando-se de achados prévios de outras series. Independentemente do tipo de lesão, a marcação foi avaliada na membrana e no citoplasma. Houve predomínio de marcação citoplasmática, geralmente homogênea, raramente granular, de intensidade geralmente maior que a de membrana. Marcação forte das hemácias presentes nos vasos e em áreas de hemorragia atesta a positividade da reação e serve como parâmetro para a avaliação de intensidade. Havia, entre as amostras, escassa representação de epitélio escamoso normal com positividade de membrana em ceratinócitos do terço basal do epitélio, perdendo-se a marcação com a maturação celular superficial, assim como é descrito em outros estudos semelhantes na literatura. As camadas córnea e de paraceratose são tipicamente negativas. Com a intensidade da marcação mais intensa no citoplasma, a marcação de membrana eventualmente é mascarada, vista como reforço citoplasmático periférico (MORIYAMA, 1997).

A imunomarcação para HK-II foi avaliada por meio de análise semiquantitativa de campos aleatórios, com contagem de um mínimo de 500 células, no aumento de 40 vezes, utilizando o software ImageJ (Research Service Branch, NIH.gov). O software avalia a porcentagem de células marcadas, estratificadas pela intensidade de marcação, sendo a positividade especialmente citoplasmática, havendo marcação com padrão de membrana em alguns casos (VARGHESE, 2014).

Tendo como base as evidências descritas anteriormente, as seguintes categorizações foram criadas para cada marcador analisado.

**p16** - Foram determinados a porcentagem de células neoplásicas positivas, a intensidade da marcação e a localização no epitélio (0 - sem coloração; 1 - células positivas isoladas coradas; 2 - coloração mais extensa, descontínua com pequenos aglomerados de células positivas; 3 - intensa e coloração contínua citoplasmática e/ou nuclear (em bloco). As células hiperkeratóticas e parakeratóticas não são coradas e foram ignoradas na avaliação (4 - não aplicável).

**p53** - Avaliação semiquantitativa baseada em três critérios: localização e espessura relativa, coloração contínua e intensidade (0- negativo: ausência de coloração ou células fracamente coradas independentemente da localização; 1- positivo fraco: células coradas forte e fraca, descontínuas, presentes em menos de 50% das células; 2- positivo moderado: coloração forte e fraca, descontínua, presente  $\geq 50\%$  das células, ou

mistura de células contíguas com marcação forte e fraca, ou células fortemente marcadas, correspondendo a <50% das células as células nos ninhos neoplásicos; 3- positivo forte: apenas células fortemente coradas em  $\geq 50\%$  das células dos ninhos neoplásicos).

**Ki67** - Porcentagem de células neoplásicas com marcação nuclear positivas (células neoplásicas positivas/todas as células neoplásicas\*100) foram anotadas de forma semiquantitativa de 0 a 100.

**GLUT-1 e Hexoquinase 2 (HK-II)** - A coloração de membrana e do citoplasma foram consideradas separadamente. Intensidade: 0- negativo, ausência de coloração ou células coradas fracamente isoladas; 1- positivas fracas, células fracas e descontínuas (25-50% da membrana); 2- coloração positiva moderada, forte e fraca, descontínua (meia a 75% da membrana); 3- positivo forte, apenas células fortemente coradas (mais de 75% da membrana); 4- não aplicável. Em seguida, somaram-se a coloração da membrana e do citoplasma e aplicou-se um índice da seguinte forma: a) HK-II: 0- sem coloração, 1- coloração somada < 3; 2- coloração somada >3 e <4,5; e 3- coloração somada >4,5. b) GLUT-1: 0- sem coloração, 1- coloração somada < 3; 2- coloração somada >3 e <4; e 3- coloração somada >4.

### 3.2.4 - DNA do HPV

A extração do DNA de HPV dos tecidos tumorais penianos foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa Belo Horizonte utilizando o protocolo Proteinase K (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Para detecção da positividade do HPV, a técnica de PCR foi primeiramente realizada com o auxílio de primers GP5+/GP6+ e controle interno da reação da beta-globina (PCO3+/PCO4+) para evitar falsos negativos. Para confirmação de amostras duvidosas, foi utilizada a técnica de Nested-PCR de variação.

### 3.2.5 - Análise de Imagem $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT

As imagens de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET foram obtidas do crânio até a raiz das coxas cerca de 60 minutos após a administração intravenosa de  $^{18}\text{F}$ -FDG na dose de 3,7 MBq/Kg (0,10 mCi/Kg). As imagens morfológicas tomográficas (TC) das mesmas regiões foram feitas antes das imagens metabólicas com baixa dose e sem contraste venoso para criar o mapa de atenuação sem fins diagnósticos.

Dois médicos com certificação nuclear, cegos para todos os estudos de imagem

clínicos e histológicos, avaliaram independentemente a  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT. Em caso de discrepância, a interpretação foi feita por consenso. Para pacientes com PET-positivo (áreas com maior captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG do que a contraparte), foi realizada uma análise semiquantitativa usando o valor máximo de captação padronizado ( $\text{SUV}_{\text{max}}$ ) em um voxel de imagem normalizado para o peso corporal do paciente (NABI, 2002). Foram analisados as captações da lesão peniana primária em cada paciente (pSUV).

Além disso, imagens de PET volumétricas foram geradas usando um algoritmo de segmentação tumoral (MAMEDE, 2007a) previamente validado em pacientes com câncer de esôfago (MAMEDE, 2007b) e reto (FAGUNDES, 2018). Este método usa um valor de limiar ajustável para gerar os volumes de imagens PET do voxel com captação máxima de  $^{18}\text{F}$ -FDG no tumor ( $T_{\text{max}}$ ). Resumidamente, uma região de interesse (ROI) compreendendo todo o fígado em uma fatia transaxial foi desenhada e a média e o desvio padrão (SD) do valor de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG ( $L_{\text{mean}}$  e  $L_{\text{SD}}$ , respectivamente) foram calculados. Para individualizar o limiar de segmentação tumoral, um valor menor de SUV tumoral ( $T_{2\text{SD}}$ ) foi gerado a partir da seguinte fórmula:  $T_{2\text{SD}} = T_{\text{max}} - (L_{\text{mean}} + 2 \times L_{\text{SD}})$  (MAMEDE, 2007a). Essa metodologia gera volumes nas imagens PET da lesão alvo ( $\text{Vol}_{2\text{SD}}$ ) e o SUV médio do volume ( $\text{SUV}_{2\text{SD}}$ ). Foi utilizada uma estação de trabalho dedicada (*Advantage Windows Workstation, GE, Milwaukee, WI, EUA*).

### 3.2.6 - Análise Estatística

A análise estatística descritiva foi realizada para todas as variáveis, enquanto um teste de normalidade foi verificado para as variáveis quantitativas (Anexo III). t-Teste e ANOVA (análise paramétrica), e Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (análise não paramétrica) foram utilizados para verificar diferenças entre as variáveis quantitativas. O teste Qui-quadrado foi aplicado a todas as variáveis qualitativas. Análise de correlação Paramétrica (Pearson) e não paramétrica (Spearman) foram utilizadas para análise quando pertinente. As análises estatísticas foram realizadas com os seguintes softwares: IBM SPSS (versão 20.00).

## 3.3 - RESULTADOS

### 3.3.1 - Achados Histopatológicos

A TABELA 1 resume as características dos 51 pacientes inicialmente analisados. Dentre eles, 80,6% tinham CEC invasivo usual. A maioria dos pacientes

apresentou grau histológico 2 (n=29, 56,8%). A presença de infecção pelo HPV foi avaliada em 42 (82,3%) amostras. HPV foi positivo em 22/42 (52,4%). Quanto à genotipagem do HPV, o subtipo 16, considerado de alto risco para associação com CEC, foi mais frequente (n=8, 36,4%) como infecção única e em 100% das coinfeções, quando foi observado mais de um tipo de HPV na amostra.

Como o CEC do tipo usual, no Câncer de Pênis invasivo, é o patologicamente mais significativo, ele foi analisado separadamente.

### **3.3.2 - Achados de PET/CT de $^{18}\text{F}$ -FDG e marcadores tumorais**

Inicialmente foram avaliados os resultados da PET/CT com  $^{18}\text{F}$ -FDG em todos os tipos histológicos e, em um segundo momento, foi feita a análise para CEC tipo usual. Os resultados de  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  e  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  em todos os tipos histológicos estão demonstrados na TABELA 1. O CEC tipo Warty apresentou o maior valor de SUV em ambas as técnicas, as diferenças das médias foram significativas para ambas as análises do PET/CT,  $\text{SUV}_{\text{max}}$  (p=0,022) e  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  (p=0,022). Comparando os valores dos SUV's com os diferentes graus tumorais, valores mais altos de  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  e  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  foram observados em tumores de grau 3. As diferenças das médias foram significativas para o  $\text{SUV}_{\text{max}}$  (p=0,018); o  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  (p=0,064) não alcançou resultado significativo. Em relação ao HPV, não houve diferenças significativas entre HPV-/+ e ambos  $\text{SUV}'_s$ .

**Tabela 1 - Características histológicas e resultados do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT dos pacientes com câncer de pênis**

Variáveis	n	%	$\text{SUV}_{\text{max}}$				n	%	$\text{SUV}_{2\text{SD}}$			
			Média	DP	Mediana	Valor p			Média	DP	Mediana	Valor p
<b>Tipo Tumoral</b>												
CEC Usual	41	80.6	17.2	8.3	16.9		38	80.9	7.3	2.2	7.1	
CEC Verrucoso	5	12.2	13.9	3.8	14.1	<b>0.022</b>	5	10.6	6.3	1.3	6.6	<b>0.022</b>
CEC <i>Warty</i>	5	12.2	26.9	5.0	24.3		4	8.5	10.4	3.2	10.3	
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100.0</b>	<b>17.9</b>	<b>8.3</b>	<b>16.9</b>		<b>47</b>	<b>100.0</b>	<b>7.5</b>	<b>2.4</b>	<b>7.1</b>	
<b>Grau Tumoral</b>												
1	11	21.6	21.6	8.5	23.1		10	21.3	8.3	3.2	6.9	
2	29	56.8	15.1	6.7	14.8	<b>0.018</b>	27	57.4	6.8	1.8	7.1	0.064
3	11	21.6	21.6	9.7	21.9		10	21.3	8.6	2.4	8.6	
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100.0</b>	<b>17.9</b>	<b>8.3</b>	<b>16.9</b>		<b>47</b>	<b>100.0</b>	<b>7.5</b>	<b>2.4</b>	<b>7.1</b>	
<b>Status HPV</b>												
Positivo	22	43.1	17.4	9.2	17.0		18	38.3	7.4	2.3	7.4	
Negativo	20	39.2	17.8	7.0	19.4	0.875	20	42.6	7.1	2.0	6.8	0.826
Não Classificado	9	17.7	-	-	-		9	19.1	-	-	-	
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100.0</b>	<b>17.9</b>	<b>8.3</b>	<b>16.9</b>		<b>47</b>	<b>100.0</b>	<b>7.5</b>	<b>2.4</b>	<b>7.1</b>	

Nota:  $\text{SUV}_{\text{max}}$ :  $\text{SUV}_{\text{max}}$  corrigido pelo peso corporal;  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$ : média de SUV usando o limiar de 2SD; DP: desvio padrão; CEC: carcinoma espinocelular.

A TABELA 2 mostra exclusivamente o tipo de CEC invasivo usual. Os valores médios mais altos de  $SUV_{bw}$  e  $SUV_{2SD}$  foram observados para tumores histológicos grau 3, HPV+, p16 negativo, p53 negativo, índice 3 para GLUT-1 e índice 3 para HK-II. As diferenças das médias foram significativas para ambas as análises do PET/CT em relação ao grau histológico tumoral; com  $SUV_{max}$  ( $p=0,035$ ) e  $SUV_{2SD}$  ( $p=0,029$ ). No entanto, para os outros parâmetros avaliados, nenhuma dessas diferenças foi estatisticamente significativa. O marcador de proliferação tumoral (Ki-67) apresentou diferenças estatísticas para tumor grau 3 ( $p=0,001$ ) e índice HK-II 1 ( $p=0,036$ ) (TABELA 2). A positividade do Ki-67 também foi maior em tumores com HPV negativo, p16 status 2, p53 status 3 e índice GLUT-1 3. No entanto, nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa (TABELA 2).

**Tabela 2 - Características histológicas, resultados de imuno-histoquímica e de PET/CT com 18F-FDG de pacientes com câncer de pênis com CEC invasivo usual**

Variáveis	n	%	SUV <sub>max</sub>			n	%	SUV <sub>2SD</sub>			n	%	Ki-67		Valor p <sup>&amp;</sup>
			Média	SD	Valor p*			Média	DP	Valor p*			Mediana	IIQ	
<b>Grau Tumoral</b>															
1	5	12.2	17.7	9.4	<b>0.035</b>	5	13.2	7.2	2.6	<b>0.029</b>	5	12.8	5.0	4.0 – 17.5	<b>0.000</b>
2	26	63.4	15.0	7.0		24	63.2	6.8	1.9		24	61.6	27.5	20.0 – 58.8	
3	10	24.4	22.9	9.2		9	23.6	9.0	2.1		10	25.6	74.0	40.0 – 80.8	
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100.0</b>	<b>17.2</b>	<b>8.3</b>		<b>38</b>	<b>100.0</b>	<b>7.3</b>	<b>2.2</b>		<b>39</b>	<b>100.0</b>	<b>30.0</b>	<b>20.0 – 70.0</b>	
<b>Status HPV</b>															
Positivo	19	46.3	17.9	9.7	0.547	14	36.8	7.7	2.4	0.187	17	43.6	30.0	20.0 – 70.0	0.602
Negativo	15	36.6	16.1	6.9		17	44.7	6.7	1.7		15	38.5	50.0	20.0 – 74.0	
Não Classificado	7	17.1	-	-		7	18.4	-	-		7	17.9	-	-	
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100.0</b>	<b>17.2</b>	<b>8.3</b>		<b>38</b>	<b>100.0</b>	<b>7.3</b>	<b>2.2</b>		<b>39</b>	<b>100.0</b>	<b>30.0</b>	<b>20.0 – 70.0</b>	
<b>Status p16</b>															
0	12	30.8	19.2	5.7	0.615	11	30.6	8.1	2.1	0.387	12	30.8	20.0	20.0 – 70.0	0.739
1	21	53.8	16.1	9.6		19	52.8	7.1	2.4		21	53.9	40.0	17.5 – 60.0	
2	6	15.4	16.5	10.0		6	16.6	6.7	2.2		6	15.3	27.5	23.8 – 80.0	
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100.0</b>	<b>17.1</b>	<b>8.5</b>		<b>36</b>	<b>100.0</b>	<b>7.3</b>	<b>2.3</b>		<b>39</b>	<b>100.0</b>	<b>30.0</b>	<b>20.0 – 70.0</b>	
<b>Status p53</b>															
0	13	33.3	19.8	8.1	0.581	12	33.3	7.7	2.1	0.553	13	33.3	30.0	12.5 – 65.0	0.515
1	8	20.5	14.9	8.2		8	22.2	6.3	2.7		8	20.5	22.5	8.8 – 64.8	
2	7	18.0	16.9	5.6		7	19.5	7.3	1.2		7	18.0	20.0	20.0 – 60.0	

3	11	28.2	15.8	10.8		9	25.0	7.7	2.7		11	28.2	50.0	25.0 – 70.0
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100.0</b>	<b>17.1</b>	<b>8.5</b>		<b>36</b>	<b>100.0</b>	<b>7.3</b>	<b>2.3</b>		<b>39</b>	<b>100.0</b>	<b>30.0</b>	<b>20.0 – 70.0</b>
<b>GLUT-1 Index</b>														
1	12	31.6	16.8	7.8		11	31.4	7.7	2.0		12	31.6	30.0	16.3 – 60.0
2	17	44.7	15.0	7.1	0.197	16	45.7	6.9	2.2	0.562	17	44.7	25.0	20.0 – 47.5 0.099
3	9	23.7	21.4	11.5		8	22.9	7.8	2.8		9	23.7	74.0	22.5 – 81.5
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100.0</b>	<b>17.1</b>	<b>8.6</b>		<b>35</b>	<b>100.0</b>	<b>7.3</b>	<b>2.3</b>		<b>38</b>	<b>100.0</b>	<b>30.0</b>	<b>20.0 – 70.0</b>
<b>HK-II Index</b>														
1	10	26.4	17.8	9.1		9	25.6	7.6	1.9		10	26.3	60.0	40.0 – 80.0
2	14	36.8	13.6	6.5	0.133	13	37.2	6.3	2.0	0.119	14	36.8	20.0	17.5 – 55.0 <b>0.036</b>
3	14	36.8	20.1	9.5		13	37.2	8.2	2.5		14	36.8	25.0	13.8 – 60.8
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100.0</b>	<b>17.1</b>	<b>8.5</b>		<b>35</b>	<b>100.0</b>	<b>7.3</b>	<b>2.3</b>		<b>38</b>	<b>100.0</b>	<b>30.0</b>	<b>20.0 – 70.0</b>

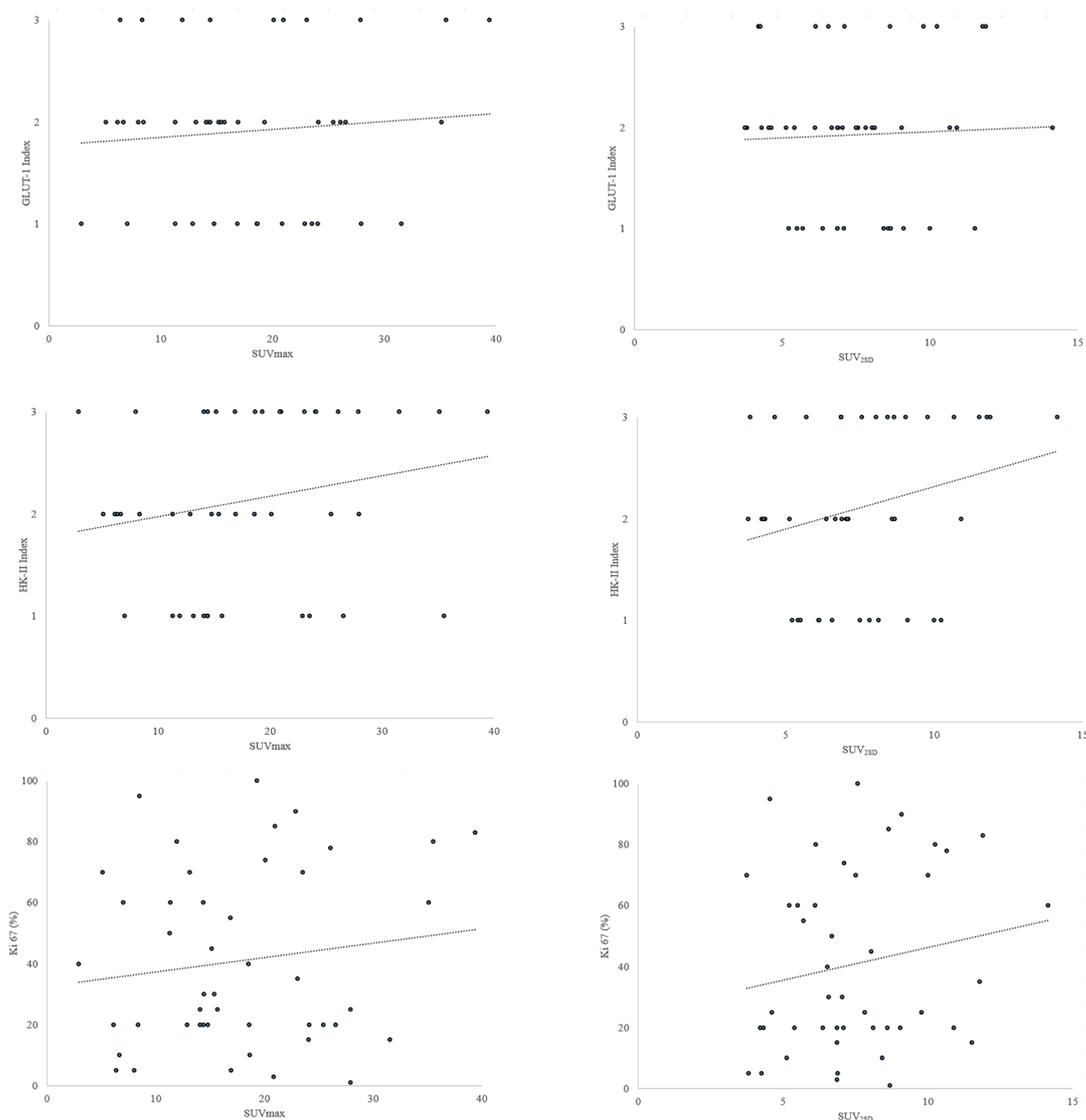
Nota: SUV<sub>max</sub>: SUV máximo peniano corrigido para o peso corporal; pSUV<sub>2SD</sub>: SUV volumétrico usando segmentação 2SD; CCE: Carcinoma de células escamosas; HPV: vírus do papiloma humano; p16-0: sem coloração; p16-1: coloração irregular; p16-2: coloração estendida; p53-0: negativo; p53-1: coloração fraca; p53-2: coloração moderada; p53-3: coloração forte; Índice GLUT 1: Índice do transportador de glicose tipo 1, Índice GLUT-1-1: coloração fraca; GLUT-1 Índice 2: coloração moderada; GLUT-1 Índice 3: forte coloração; Índice HK-II: Índice Hexoquinase tipo II; HK-II Índice 1: coloração fraca; Índice HK-II 2: coloração moderada; Índice HK-II 3: coloração forte; \*: Teste t ou ANOVA; &: Teste U Mann Whitney ou Teste Kruskal Wallis.

A TABELA 3 resume a análise de correlação entre os valores de SUVs e Ki-67, GLUT-1 e HK-II. As correlações mostraram resultados positivos para Ki-67% e PET/CT ( $SUV_{max}=0,207$  e  $SUV_{2SD}=0,243$ ) (FIGURA 1). Resultados semelhantes foram observados para HK-II ( $SUV_{max}=0,138$  e  $SUV_{2SD}=0,139$ ) (FIGURA 1). Quanto ao GLUT-1, o  $SUV_{max}$  apresentou correlação positiva, enquanto o  $SUV_{2SD}$  não apresentou correlação (coeficiente de Spearman: 0,174 e -0,004, respectivamente).

**Tabela 3 – Coeficientes de Correlação**

Marcadores	n	SUV <sub>max</sub>		n	SUV <sub>2SD</sub>	
		Coefficiente	Valor p		Coefficiente	Valor p
<b>Ki 67 (%)*</b>	39	0.207	0.205	36	0.243	0.132
<b>Glut-1 i**</b>	38	0.174	0.295	35	-0.004	0.983
<b>HK-II i**</b>	38	0.138	0.408	35	0.139	0.427

Nota: SUV<sub>max</sub>: SUV máximo peniano corrigido para o peso corporal; pSUV<sub>2SD</sub>: SUV volumétrico usando segmentação 2SD; GLUT-1 i: índice do tipo 1 do transportador de glicose; HK-II I: índice de Hexoquinase Tipo II; \*: Coeficiente de Spearman; \*\*: Coeficiente de Pearson.



**FIGURA 1 – Correlações entre  $^{18}\text{F}$ -FDG PET e marcadores moleculares tumorais.**

Em relação à diferenciação tumoral, resultados de HPV e marcadores moleculares, a TABELA 4 resume as análises do qui-quadrado. Os tumores de HPV foram mais numerosos. Em ambas as categorias de HPV, a maioria dos pacientes apresentava tumores de grau 2. p53 e p16 tiveram resultados semelhantes 67% e 69% respectivamente foram positivos para esses marcadores, sendo a maioria tumores grau 2. GLUT-1 e HK-II apresentaram resultados semelhantes; 68% e 74%, respectivamente, apresentaram maior positividade para esses marcadores, sendo que a maioria estava nas categorias 2 e 3 de grau tumoral. Nenhuma análise mostra qualquer significância estatística. As FIGURAS 2 e 3 mostram resultados típicos e as conexões entre as variáveis avaliadas.

**Tabela 4 - Análise Qui-Quadrado de marcadores moleculares e grau tumoral**

Variável	n	Grau Tumoral			Valor p
		1	2	3	
<b>HPV</b>					
Negativo	15	2	10	3	0.682
Positivo	19	1	13	5	
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>3</b>	<b>23</b>	<b>8</b>	

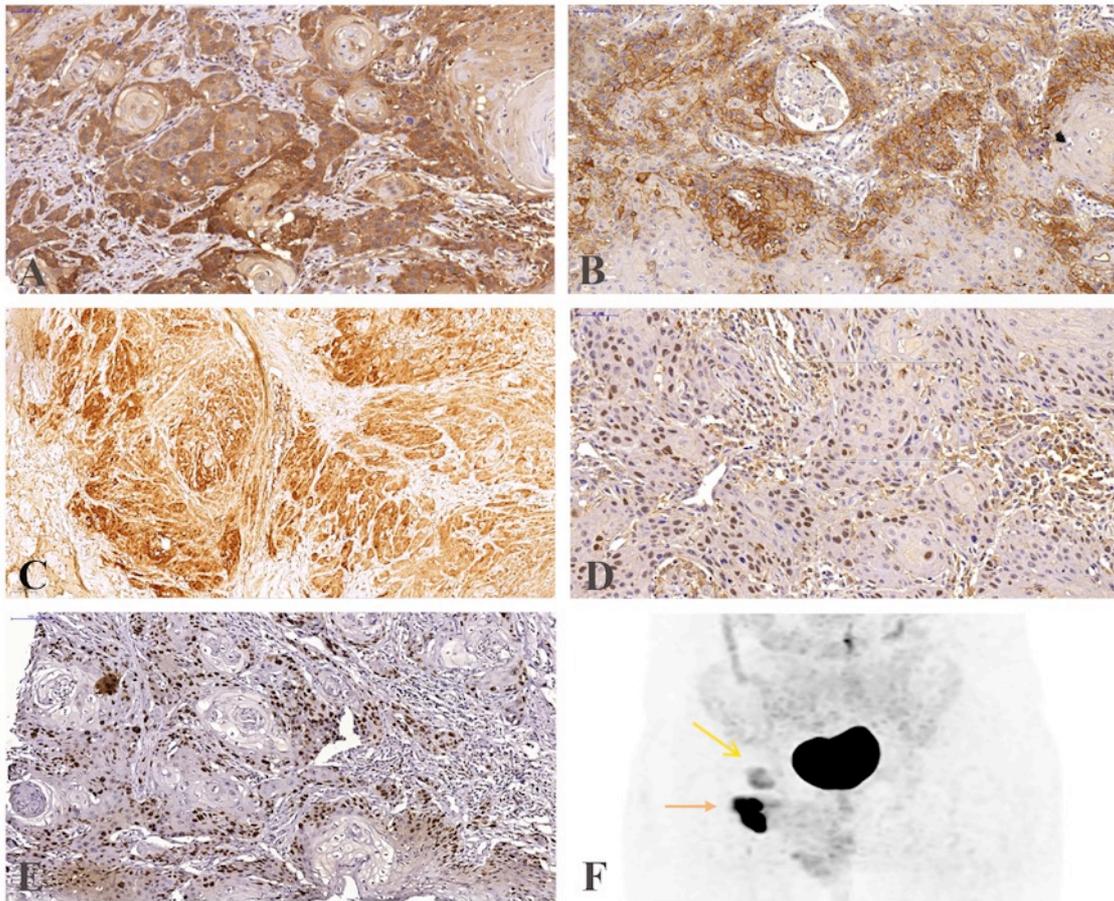
<b>p16</b>					
0	12	2	7	3	0.570
1	21	3	14	4	
2	6	0	3	3	
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>5</b>	<b>24</b>	<b>10</b>	

<b>p53</b>					
0	13	3	8	2	0.734
1	8	1	5	2	
2	7	1	4	2	
3	11	0	7	4	
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>5</b>	<b>24</b>	<b>10</b>	

<b>GLUT-1 Index</b>					
1	12	3	8	1	0.271
2	17	1	11	5	
3	9	1	4	4	
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>5</b>	<b>23</b>	<b>10</b>	

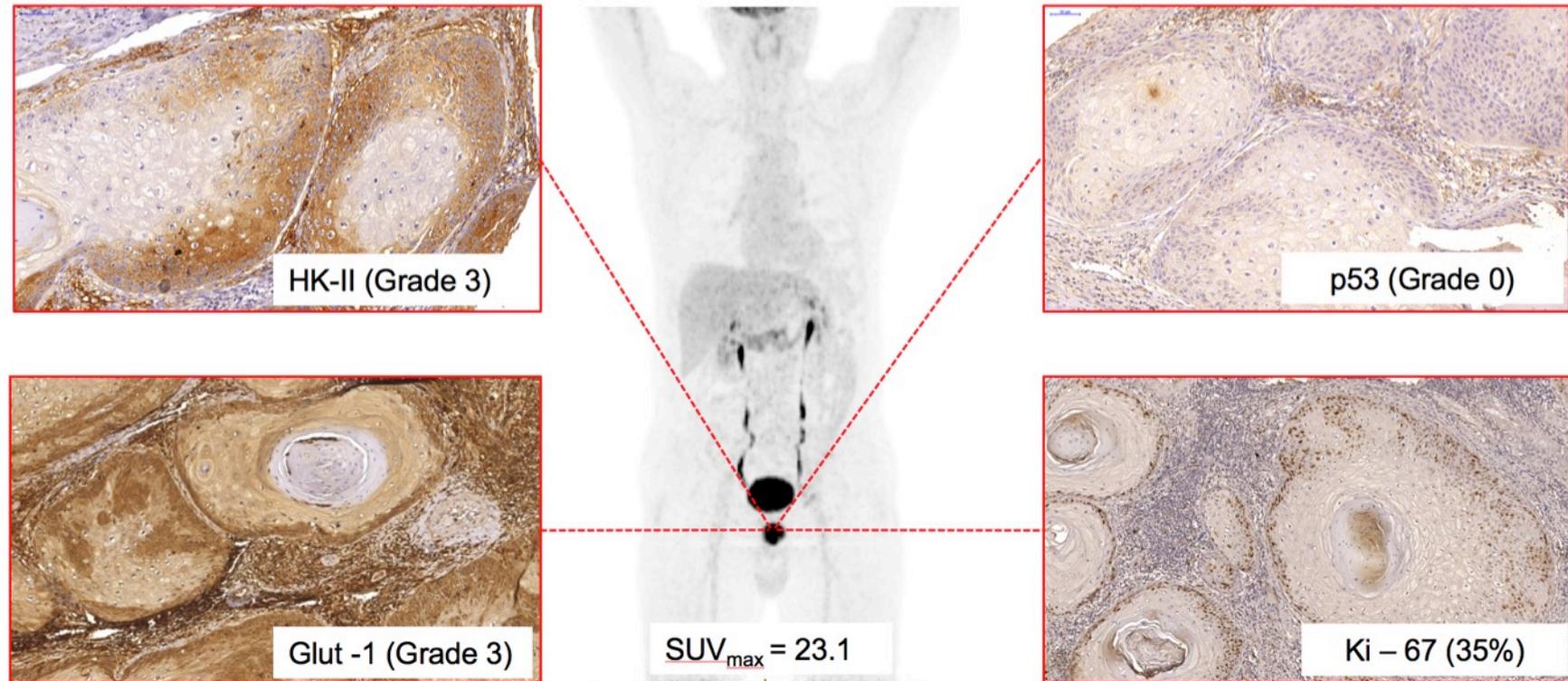
<b>HK-II Index</b>					
1	10	0	5	5	0.255
2	14	3	9	2	
3	15	2	9	3	
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>5</b>	<b>23</b>	<b>10</b>	

Nota: HPV: Papilomavírus humano; p16-0: sem coloração; p16-1: coloração irregular; p16-2: coloração estendida; p53-0: negativo; p53-1: coloração fraca; p53-2: coloração moderada; p53-3: coloração forte; Índice GLUT 1: Índice do transportador de glicose tipo 1, Índice GLUT-1-1: coloração fraca; GLUT-1 Índice 2: coloração moderada; GLUT-1 Índice 3: forte coloração; Índice HK-II: Índice Hexoquinase tipo II; HK-II Índice 1: coloração fraca; Índice HK-II 2: coloração moderada; Índice HK-II 3: coloração forte;



**FIGURA 2 - Marcadores Moleculares de Tumor e  $^{18}\text{F}$ -FDG PET de um Exemplo Típico de Câncer de Pênis**

Nota: subtipo usual de PC, grau 3, HPV+. A) GLUT-1 índice 3; B) Hexoquinase-II índice 3; C) p16 grau 1; D) p53 grau 3; E) Ki67 com 83% de positividade nuclear difusa; F)  $^{18}\text{F}$ -FDG PET:  $\text{nSUV}_{\text{max}} = 6,5$  (seta amarela).



**FIGURA 3 – Conexões dos Marcadores Moleculares do Câncer de Pênis e o  $^{18}\text{F}$ -FDGPET/CT SUV<sub>max</sub> lesão primária peniana.**

### 3.4 - DISCUSSÃO

A  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT está estabelecida como ferramenta em ascensão na avaliação dos pacientes com câncer de pênis de alto risco metastático (CHAHOU, 2020). As diferenças significativas observadas das médias do SUV (em ambas as metodologias), em relação ao maior grau tumoral, situa a análise metabólica em concordância com a patologia. Dessa forma, estes resultados corroboram a análise anterior desta série, na qual foram estabelecidos pontos de corte do  $\text{SUV}_{\text{max}}$  objetivando-se determinar pior prognóstico tumoral (SALAZAR, 2019).

A

justificativa, em oncologia, para se correlacionar os resultados do  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT com diferentes marcadores tumorais, baseia-se no fato de que células cancerígenas apresentam sua maior expressão em cenários de maior agressividade tumoral. Este fenótipo específico confere vantagem adaptativa significativa durante a evolução somática do câncer. (XINTAROPOULOU, 2018). Os resultados aqui apresentados, permitem um melhor entendimento da fisiopatologia da incorporação do FDG nas células tumorais. Esta análise poderá ser agregada a resultados futuros e propiciar aumento na acurácia diagnóstica nos tumores penianos, além de evidenciar potenciais alvos terapêuticos.

Especificamente em relação ao GLUT-1, sua acentuada expressão em células cancerígenas é associada à maior captação da glicose e ao pior prognóstico (CANTUARIA, 2001). Em se tratando da neoplasia peniana, Moriyama et al. descreveram o primeiro e único relato da expressão de GLUT-1 nestes tumores. Os autores associaram a superexpressão de GLUT-1 com o aumento do metabolismo da glicose tumoral nos pacientes com câncer de pênis (MORIYAMA, 1997). O presente trabalho demonstrou resultados semelhantes. O câncer de pênis apresentou importante expressão de GLUT-1. Sendo que, em tumores com maior captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG, o GLUT-1 registrou maior positividade. Este fato está em acordo com a teoria de aumento dos transportadores glicolíticos e o maior metabolismo associado (MEYER, 2019). Os pacientes com maior expressão de GLUT-1 apresentaram tumores penianos com graus tumorais mais elevados, sugerindo tumores mais agressivos. Em ambas as análises dos resultados do PET/CT (expressa como  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  e  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$ ), as diferenças apresentadas não foram estatisticamente significativas, mas estão em concordância com a hipótese inicialmente proposta. Vale ressaltar que a família dos transportadores de Glicose (GLUT) é composta por 14 membros, nesta série foi avaliada a relação da expressão

somente do GLUT-1. O carcinoma espinocelular oral é uma neoplasia maligna prevalente e de mau prognóstico. Nestes tumores, o GLUT-3 correlacionou-se negativamente com a sobrevida global (BOTHA, 2021). Dessa forma, a avaliação futura, no câncer de pênis, de outros diferentes tipos de GLUT, poderá tornar os resultados mais consistentes.

Séries que avaliam a expressão molecular de marcadores com resultados da captação de radiotraçadores na PET/CT são cada vez mais frequentes. Porém, devido às particularidades das análises e o método em si, os resultados seguem tendências positivas, mas com fraca significância. Em um recente estudo sobre a expressão de GLUT-1 e captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET em câncer de pâncreas, os pacientes com  $\text{SUV}_{\text{max}}$  elevado apresentaram alta expressão de GLUT-1. Porém de forma semelhante à presente série de CP, os resultados não foram estatisticamente significativos. Os autores relacionaram essas discrepâncias aos  $\text{SUV}_{\text{max}}$  falsos positivos, muitas vezes relacionados a processos inflamatórios e inerentes do método do PET/CT. Além de outras limitações como a análise retrospectiva e de um único centro e um único tipo de GLUT avaliado (TAKAHASHI, 2020). As mesmas justificativas podem ser extrapoladas para os resultados aqui apresentados. Uma vez que também se trata de uma série retrospectiva e de um único centro. Particularmente, em se tratando de CP, sua baixa prevalência contribui para dificultar a realização de estudos com número maior de pacientes.

Seguindo o mesmo padrão anteriormente descrito para GLUT-1, os tumores penianos com alta expressão de HK-II apresentaram elevados valores de captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Kozaka et al. relataram correlações de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT com expressões de GLUT-1 e HK-II em colangiocarcinoma. Os autores observaram que os colangiocarcinomas de grandes ductos apresentaram valores de SUV mais altos. Além disso, se correlacionaram positivamente com os maiores escores de GLUT-1 e HK-II (KOZAKA, 2020). Essa evidência ratifica as correlações positivas aqui encontradas no câncer de pênis, entre  $\text{SUV}_{\text{bw}}$  e  $\text{SUV}_{2\text{SD}}$  e com os mesmos marcadores tumorais (GLUT-1 e HK-II). A importância da expressão elevada do HK-II relaciona-se com tumores com maior metabolismo e, dessa forma, representa um marcador de alta proliferação celular e possível alvo terapêutico (HUI, 2018) (CHEN, 2014).

A proliferação celular, expressa através do percentual de células tumorais coradas com Ki-67, é um marcador de mau prognóstico em cânceres (YANG, 2017). A captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG é um bom preditor de proliferação tumoral e correlaciona-se

positivamente com a expressão de Ki-67 (DENG, 2015). Na série de câncer de pênis aqui analisada, o elevado percentual de positividade do Ki-67 apresentou o maior coeficiente de correlação com os valores de  $SUV_{bw}$  e  $SUV_{2SD}$  entre todas as variáveis avaliadas. Este resultado sugere que os resultados do PET estão alinhados com os do marcador Ki-67, corroborando o uso da tecnologia na avaliação de proliferação celular não invasivamente pelo PET.

Em um recente trabalho avaliando pacientes com linfoma, foram descritas robustas correlações positivas entre a expressão do Ki-67 e a captação de  $^{18}F$ -FDG. O tamanho das lesões e o grau histológico também correlacionaram com o PET, sugerindo um comportamento mais agressivo na prática clínica dos tumores com esses achados (ZHAO, 2021). De forma semelhante, nos tumores penianos, o elevado percentual de positividade de Ki-67 foi associado a grau histológico tumoral maior. Este resultado implica em substancial potencial de agressividade. No câncer de mama, por sua vez, o KI-67 está estabelecido como marcador de proliferação. Recentes evidências demonstraram forte correlação entre os resultados semiquantitativos e volumétricos do  $^{18}F$ -FDG PET/CT, associados ao marcador de proliferação Ki-67 nos cânceres de mama. O PET/CT foi sugerido como possível alternativa diagnóstica não invasiva, para avaliação da proliferação celular substituindo o teste de IHQ (MOHAMADIEN, 2021).

Correlacionando os marcadores tumorais entre si, observou-se maior expressão do Ki-67 em tumores com maior índice GLUT-1. Por outro lado, foram observados resultados inversos para a positividade de HK-II, contrariando a hipótese de elevada proliferação celular e o possível aumento deste marcador. Tumores mais agressivos têm maior taxa de proliferação e, de fato, precisam de uma maior concentração intracelular de glicose ( $^{18}F$ -FDG) que depende da superexpressão de GLUT-1 (transporte para meio intracelular) e da atividade da hexoquinase (HK-II). No entanto, como já descrito, o valor desses resultados correlacionados com a expressão do Ki-67 é controverso mesmo em outras neoplasias (PARK, 2012). Esse resultado discrepante, novamente, pode estar relacionado à natureza retrospectiva de nossa amostra e ao baixo número de pacientes. Os resultados indicam a necessidade da avaliação futura de outras proteínas para se obter melhores expressões. Uma vez que da família de quatro hexoquinases, somente a HK-II foi avaliada.

Em relação à positividade do HPV nas células de câncer de pênis analisadas, ambos  $SUV_{bw}$  e  $SUV_{2SD}$  apresentaram mais intensa captação nos tumores HPV+. O CEC do tipo warty apresentou os maiores valores de pSUV. As diferenças de captação

encontradas em relação aos diferentes tipos histológicos, foram significativas para ambos os  $SUV_{max}$  e  $SUV_{2SD}$ . O tipo histológico verrucoso está relacionado à positividade do HPV e melhor prognóstico (CANETE-PORTILLO, 2020). De forma semelhante, avaliando o CEC do tipo usual isoladamente, observaram-se maiores captações nos tumores HPV+. Dessa forma, o resultado descrito sugere que a infecção pelo HPV ocasiona aumento da incorporação da glicose na célula tumoral. Além de possível vício para a análise dos valores de SUV nesta categoria de pacientes.

O maior percentual de células tumorais Ki-67 positivas foi evidenciado nos pacientes HPV-. A partir dos resultados anteriormente descritos sobre a positividade do HPV, é possível inferir que a maior captação de  $^{18}F$ -FDG nos tumores HPV+, pode não significar espécies tumorais com pior comportamento biológico. Uma vez que, os tumores HPV- são os que mais expressam o Ki-67, e este marcador está sabidamente associado a tumores mais agressivos no CP (ZECAN, 2021). De forma semelhante, em pacientes com CEC de cabeça e pescoço, o  $^{18}F$ -FDG PET/CT foi menos confiável para avaliar pacientes HPV+. Em uma meta-análise atual, os autores concluíram que a infecção pelo HPV poderia funcionar como um fator na redução do desempenho diagnóstico do  $^{18}F$ -FDG PET/CT nesse tipo tumoral. Além disso, os resultados sugeriram ser mais robustos em tumores de HPV- (HELSEN, 2018). Consequentemente, em câncer de pênis não relacionado ao HPV, a alta captação de  $^{18}F$ -FDG é mais crítica e sugere identificar tumores com pior prognóstico.

O p16, representa um marcador de positividade do HPV, é uma alternativa para análises de PCR de DNA. No presente trabalho, p16 positivo (independentemente do status de positividade) apresentou valores menores de  $SUV_{bw}$  e  $SUV_{2SD}$  (sem diferença significativa). Vale observar que a variabilidade do leitor pode prejudicar as análises. A acurácia da infecção pelo HPV através do status p16 varia na literatura. Os principais fatores são diferentes técnicas de coloração, avaliação da variabilidade entre leitores, erro humano e erro de amostragem (PEETERS, 2019). Esses fatores podem potencialmente influenciar os resultados conflitantes atuais. Evidências recentes relatam essa possível discrepância de resultados de p16 na detecção de HPV e sugerem um ensaio multiplex para evitar erros de classificação desses tumores (ZITO, 2021). Em uma revisão sistemática, Sand et al. (SAND, 2018) concluíram que a presença de DNA de HPV ou p16 positivo é uma variável de bom prognóstico em pacientes com câncer de pênis. Na presente série, como descrito anteriormente, pacientes HPV- apresentaram valores mais elevados de expressão de Ki-67. Reiterando que, como o Ki-67 representa

um marcador de proliferação tumoral, esse resultado está de acordo com a teoria da positividade do HPV e melhor prognóstico do tumor, conforme descrito acima.

A p53 é uma proteína que desempenha papel essencial na supressão tumoral e na resposta celular a danos ao DNA. Não há consenso, em diferentes tumores, sobre o valor real da expressão de p53. Alguns autores indicaram a elevada expressão de p53 como preditor de melhor sobrevida global (WANG, 2016). No entanto, outra série, relata que a superexpressão de p53 pode representar pior prognóstico (TSAO, 2007). Neste estudo, células CP positivas para p53 apresentaram  $SUV_{bw}$  ligeiramente menor, mas nenhuma diferença em relação a  $SUV_{2SD}$  (ambos não significativos). Além disso, a positividade de p53 também não apresentou diferença significativa em relação ao percentual de expressão do marcador proliferativo Ki-67. Dessa forma não foi encontrado nenhuma diferença que sugerisse um comportamento neoplásico distinto. Como apontado anteriormente, vale observar a significativa variabilidade interleitores que pode impactar negativamente as análises. Dados recentes de uma revisão sistemática, sugerem que o SUV não pode ser avaliado como um potencial marcador da expressão de p53. Os resultados foram conflitantes nas séries avaliadas (SUROV, 2018).

As principais limitações deste estudo foram seu desenho retrospectivo, realizado em um único centro, e o pequeno número de pacientes, que são potenciais fontes de vícios de seleção. Além disso, as técnicas de coloração e avaliação IHQ podem gerar resultados discrepantes. Futuramente, estudos prospectivos adicionais são necessários para avaliar o potencial dessas variáveis na análise de pacientes com câncer de pênis.

### 3.5- CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a importância da  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT associada à expressão de marcadores tumorais em pacientes com câncer de pênis. A elevada captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG correlacionou-se com maior expressão de marcadores do metabolismo glicolítico e de proliferação celular. Esta associação de resultados poderá ser uma possível forma de se identificar tumores com comportamento biológico de maior agressividade.

Pacientes HPV negativos apresentaram resultados para o PET/CT mais significativos e um potencial proliferativo mais crítico. Não houve resultados significativos em relação à positividade de p16 e p53. Estudos semelhantes são necessários para aumentar o número de pacientes tornando as evidências mais robustas.

#### 4 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AFONSO, L.A., et al. High Risk Human Papillomavirus Infection of the Foreskin in Asymptomatic Men and Patients with Phimosis. *J Urol*, 2016. 195: 1784.
2. ALKATOUT, I., et al. Squamous cell carcinoma of the penis: predicting nodal metastases by histologic grade, pattern of invasion and clinical examination. *Urol Oncol*, 2011. 29: 774.
3. ALNAJJAR, H.M., et al. Treatment of carcinoma in situ of the glans penis with topical chemotherapy agents. *Eur Urol*, 2012. 62: 923.
4. AMBROSINI, V., et al. PET/CT imaging in different types of lung cancer: an overview. *Eur J Radiol* .2012; 81:988-1001
5. AMERICAN CANCER SOCIETY, American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2022*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2022. - <http://www.cancer.org/cancer/penilecancer/detailedguide/penile-cancer-key-statistics>, acessado em 18/02/2022.
6. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Penis. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017: 701-714.
7. AMIN, M.B., et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. ed.8 Cham, Switzerland: Springer; 2017.
8. ANCEY, P.B., et al. Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J*, 2018. 285 2926–2943. [Epub ahead of print]
9. BOTHA, H., et al. The Role of Glucose Transporters in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*. 2021 Jul 21;11(8):1070.
10. BOZZINI, G., et al. Role of Penile Doppler US in the Preoperative Assessment of Penile Squamous Cell Carcinoma Patients: Results From a Large Prospective Multicenter European Study. *Urology*, 2016. 90: 131.
11. BRIERLEY, J.D., et al. *TNM Classification of Malignant Tumours*. ed. 8 Oxford, UK: Wiley Blackwell; 2017.
12. BRIITEBO, E.B., et al. Sites of metabolism of N-Nitrosodiethylamine in mice. *Chem Biol Interact* (1981); 34:209–221.
13. BRODERS, A.C., Squamous-cell epithelioma of the skin: a study of 256 cases. *Ann Surg* 1921;73:141–60

14. BUSTAMANTE, E., et al. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:3735- 3739.
15. CAETANO, R., et al. Análise dos custos do procedimento PET-TC com 18F-FDG na perspectiva do SUS provedor: estudo em uma unidade pública de saúde do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2014 Feb;30(2):379-92
16. CANTUÁRIA, G., et al. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer*. 2001;92:1144–50.
17. CHAI, Y.J., et al. Upregulation of SLC2 (GLUT) family genes is related to poor survival outcomes in papillary thyroid carcinoma: analysis of data from The Cancer Genome Atlas. *Surgery* . 2017. 161, 188–194.
18. CHAKIRYAN, N.H., et al. Risk factors and survival outcomes for upstaging after inguinal lymph node dissection for cN1 penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2021 Dec;39(12):838.e7-838.e13.
19. CHAUX A., et al. Distinctive association of p16INK4a overexpression with penile intraepithelial neoplasia depicting warty and/or basaloid features: a study of 141 cases evaluating a new nomenclature. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):385-92.
20. CLARK, P.E., et al. National Comprehensive Cancer Network. Penile cancer: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* (2013); 11:594-615
21. COELHO, R.W.P., et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? *BMC Urology* (2018) 18:50
22. COUSSENS, L.M., et al. Inflammation and cancer. *Nature* (2002); 420:860–867.
23. CUBILLA A.L., et al. Value of p16(INK)<sup>4</sup>(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases. *Am J Surg Pathol*. 2011 Feb;35(2):253-61.
24. CUBILLA, A.L., et al. Value of p16(INK)(4)(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases. *Am J Surg Pathol*. 2011; 35:253 -261
25. CUBILLA, A.L., et al. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the pênis. *World J Urol* (2009) 27:169–177

26. CUBILLA, A.L., et al. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. A prospective study of 66 cases. *Am J Surg Pathol* (1993); 17:753-763
27. CUBILLA, A.L., et al. The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. *Histopathology*. 2018 May;72(6):893-904
28. DE GEUS-OEI, L.F., et al. Biological correlates of FDG uptake in nonYsmall cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007;55:79Y87.
29. DELBEKE, D., et al. Procedure guideline for tumor imaging with 18F-FDG PET/CT 1.0. *J Nucl Med* (2006); 47:885-895
30. DJAJADININGRAT, R.S., et al. Human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer and association with clinical outcome, *J Urol*, 2014.08.087: 93.
31. DJAJADININGRAT, R.S., et al. Penile sparing surgery for penile cancer-does it affect survival? *J Urol*, 2014. 192: 120
32. DOUGLAWI, A., et al. Penile cancer epidemiology and risk factors: a contemporary review. *Curr Opin Urol*. 2019 Mar;29(2):145-149.
33. DOWSETT, M., et al. (2011) Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 103(22):1656–1664
34. FAGUNDES, T.C., et al. Individualized threshold for tumor segmentation in 18F-FDG PET/CT imaging: The key for response evaluation of neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with rectal cancer? *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2018 Feb;64(2):119-126.
35. FLAVAHAN, W.A., et al. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci*. 2013. 16, 1373–1382.
36. GENTILE V, et al. Detection of human papillomavirus DNA, p53 and ki67 expression in penile carcinomas. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006 Jan-Mar;19(1):209-15.
37. GRAAFLAND, N.M., et al. Prognostic factors for occult inguinal lymph node involvement in penile carcinoma and assessment of the high-risk EAU subgroup: a two-institution analysis of 342 clinically node-negative patients. *Eur Urol* (2010); 58:742-747.

38. GUESTINI, F., et al. Impact of Topoisomerase II $\alpha$ , PTEN, ABCC1/MRP1, and KI67 on triple-negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Oct 10, 234-239.
39. GUNIA S, et al. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. *J Clin Pathol.* 2012 Mar;65(3):232-6.
40. HAKENBERG, O.W., et al. European Association of Urology Guidelines: penile cancer. Uroweb website. <https://uroweb.org/guideline/penile-cancer/>. Published 2018. Accessed March, 2022.
41. HAN, A.L., et al. Fibulin-3 promotes muscle-invasive bladder cancer. *Oncogene.* 2017. 36, 5243–5251.
42. HANAHAN, D., et al. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011, 144, 646–674.
43. HANCHANALE, V., et al. The accuracy of magnetic resonance imaging (MRI) in predicting the invasion of the tunica albuginea and the urethra during the primary staging of penile cancer. *BJU Int*, 2016. 117: 439.
44. HAUSEN Z., H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—A brief historical account. *Virology* (2009); 384:260–265
45. HEALEY M.A., et al. Assessment of Ki67 expression for breast cancer subtype classification and prognosis in the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Nov;166(2):613-622.
46. HUGHES B, et al. Noninvasive and minimally invasive staging of regional lymph nodes in penile cancer. *World J Urol* (2009); 27:197–203
47. HUGHES BE, et al. Lymph node metastasis in intermediate-risk penile squamous cell cancer: a two-centre experience. *Eur Urol* (2010); 57:688-692
48. INCA - Instituto Nacional do Câncer, 2021 <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/penis>, acessado em 01/03/2022.
49. JACKSON, I.M., et al. Clinical Applications of Radiolabeled Peptides for PET. *Semin Nucl Med.* 2017 Sep;47(5):493-523.
50. JAKOBSEN JK, et al. DaPeCa-3: promising results of sentinel node biopsy combined with 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in clinically lymph node-negative patients with penile cancer - a national study from Denmark. *BJU Int.* 2015;28:1–10.

51. KAIDA, H., et. al., Correlations between dual-phase 18F-FDG uptake and clinicopathologic and biological markers of breast cancer. *Hell J Nucl Med.* 2018 Jan-Apr;21(1):35-42.
52. KAPOOR V, et al. An introduction to PET-CT imaging. *Radiographics* (2004); 24:523-543.
53. KAYES O, Minhas S, Allen C, et al. The role of magnetic resonance imaging in the local staging of penile cancer. *Eur Urol* (2007); 51:1313-1318.
54. KIDD L.C. et al. Relationship between human papillomavirus and penile cancer— implications for prevention and treatment *Transl Androl Urol* 2017;6(5):791-802
55. KIM Y.W., et al. Expression of the GLUT1 glucose transporter, p63 and p53 in thyroid carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2006;202:759–65.
56. KIM, Y.H., et al. SLC2A2 (GLUT2) as a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. 2017. *Oncotarget* 8, 68381–68392.
57. KIRRANDER, P., et. al. Dynamic sentinel node biopsy in penile cancer: initial experiences at a Swedish referral centre. *BJU Int* (2013); 111:E48-53.
58. KOIFMAN, L., et al. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. *Int Braz J Urol*, 2011. 37: 231.
59. KOIFMAN, L., et al. Radical open inguinal lymphadenectomy for penile carcinoma: surgical technique, early complications and late outcomes. *J Urol*, 2013. 190: 2086.
60. KOPPENOL, W.H., et al. Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* (2011); 11:618
61. KOSTAKOGLU, L., et al. PET-CT fusion imaging in differentiating physiologic from pathologic FDG uptake. *Radiographics* (2004); 24:1411-1431.
62. KRISHNA, R.P., et al. Sonography: an underutilized diagnostic tool in the assessment of metastatic groin nodes. *J Clin Ultrasound*, 2008. 36: 212.
63. KUANG, R., et al. GLUT3 upregulation promotes metabolic reprogramming associated with antiangiogenic therapy resistance. 2017. *JCI Insight* 2, e88815.
64. KULKARNI, J.N., et al. Prophylactic bilateral groin node dissection versus prophylactic radiotherapy and surveillance in patients with N0 and N1-2A carcinoma of the penis. *Eur Urol* (1994); 26:123-128
65. LEIJTE, J.A., Gallee M, Antonini N, Horenblas S. Evaluation of current TNM classification of penile carcinoma. *J Urol* 2008;180:933–8

66. LEIJTE, J.A., et al. Multi-institutional evaluation of dynamic sentinel node biopsy for penile carcinoma. *Eur Urol* (2008); 7:110.
67. LEIJTE, J.A., et al. Neoadjuvant chemotherapy in advanced penile carcinoma. *Eur Urol*, 2007. 52: 488.
68. LEIJTE, J.A., et al. Recurrence patterns of squamous cell carcinoma of the penis: recommendations for follow-up based on a two-centre analysis of 700 patients. *Eur Urol*, 2008. 54: 161.
69. LEINO, R.L., et. al. Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res*. 1997. 49, 617–626.
70. LEVINE, A.J., et al. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):749-58.
71. LI, J., et al. Organ-sparing surgery for penile cancer: complications and outcomes. *Urology*, 2011. 78:1121-1124.
72. LI, Z.S., Yao K, Chen P, et al. Modification of N staging systems for penile cancer: a more precise prediction of prognosis. *Br J Cancer* 2015;113:1746.
73. LIBERTI, M.V., et al. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211-218
74. LONT, A.P., et al. Presence of high risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer* (2006)
75. LONT, A.P., et al. A comparison of physical examination and imaging in determining the extent of primary penile carcinoma. *BJU Int*, 2003. 91: 493.
76. LUNT, S.Y, et al. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27, 441–464.
77. MACHAN, M., et al. Penile Squamous Cell Carcinoma: Penis-Preserving Treatment With Mohs Micrographic Surgery. *Dermatol Surg*, 2016. 42: 936.
78. MADSEN, B.S., et al. Risk factors for squamous cell carcinoma of the penis—Population-based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev* (2008); 17:2683–2691
79. MAMEDE, M., et al., FDG-PET/CT tumor segmentation-derived indices of metabolic activity to assess response to neoadjuvant therapy and progression-free survival in esophageal cancer: correlation with histopathology results. *Am J Clin Oncol*. 2007;30:377–88

80. MAMEDE, M., et al., Pre-operative estimation of esophageal tumor metabolic length in FDG-PET images with surgical pathology confirmation. *Ann Nucl Med* 2007, 21:553-562
81. MAMEDE, M., et al. [18F]FDG Uptake and PCNA, Glut-1, and Hexokinase-II Expressions in Cancers and Inflammatory Lesions of the Lung. *Neoplasia*. 2005; 7: 369-379
82. MARTINS, A.C., et al. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. *J Urol* 2002;167:89–92: [discussion-3].
83. MATHUPALA, S.P., Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*. 2006;25:4777-4786
84. MENDES LOBÃO, W., et al. Low coverage of HPV vaccination in the national immunization programme in Brazil: Parental vaccine refusal or barriers in health-service based vaccine delivery? 2018; *PLoS ONE* 13(11): e0206726.
85. MERRALL, N.W., et al. Growth factors, mitochondria, oncogenes and the regulation of glucose transport. *Cell Signal*. 1993; 5, 667 – 675.
86. MOCH, H., Et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *EUROPEAN UROLOGY* 70 (2016) 93–105
87. MOHANTY, S.K., et al. p53 and p16<sup>ink4a</sup> As Predictive and Prognostic Biomarkers for Nodal metastasis and Survival in A Contemporary Cohort of Penile Squamous Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2021 Dec;19(6):510-520.
88. MORIYAMA, N., Immunohistochemical expression of glucose transporter-1 in human penile proliferative lesions. *Histochem J*. 1997 Apr;29(4):273-8.
89. MUELLER-LISSE, G., et al. Functional imaging in penile cancer: PET/computed tomography, MRI, and sentinel lymph node biopsy. *Curr Opin Urol*, 2008. 18: 105.
90. MUNGER, K., et al. “p16 in HPV-associated cancers.” *Oncotarget* vol. 4,11 (2013): 1864-5.
91. NABI, H.A., et al. Clinical applications of (18)F-FDG in oncology. *J Nucl Med Technol*. 2002 Mar;30(1):3-9; quiz 10-1. PMID: 11948260.
92. NISHIMUKAI, A., et al. Tumor size and proliferative marker geminin rather than Ki67 expression levels significantly associated with maximum uptake of

- 18F- deoxyglucose levels on positron emission tomography for breast cancers. *PLoS One*. 2017; 12(9): e0184508.
93. OERTELL, J., et al. Differentiated precursor lesions and low-grade variants of squamous cell carcinomas are frequent findings in foreskins of patients from a region of high penile cancer incidence. *Histopathology* (2011); 58:925-933
  94. ORNELLAS, A.A., et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol*, 2008. 97: 487.
  95. OTTENHOF, S., et al. The role of PET/CT imaging in penile cancer. *Transl Androl Urol*. 2017 Oct;6(5):833-838.
  96. PANER, P.G., et al. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *Eur Urol*. 2018 Apr;73(4):560-569.
  97. PARTOVI, S., et al. Qualitative and Quantitative Performance of 18F-FDG-PET/MRI versus 18F-FDG-PET/CT in Patients with Head and Neck Cancer. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014 Oct;35(10):1970-5
  98. PETER, M., et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* (2006), 25:5985–5993
  99. PETRALIA, G., et al. Local staging of penile cancer using magnetic resonance imaging with pharmacologically induced penile erection. *Radiol Med*, 2008. 113: 517
  100. PHILIPPOU, P., et al. Conservative surgery for squamous cell carcinoma of the penis: resection margins and long-term oncological control. *J Urol*, 2012. 188: 803.
  101. PIVA, L., et al. [Therapeutic alternatives in the treatment of class T1N0 squamous cell carcinoma of the penis: indications and limitations]. *Arch Ital Urol Androl*, 1996. 68: 157.
  102. PROTZEL, C., et al. Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. *Histol. Histopathol*. 2007, 22, 1197–1204.
  103. RAVIZZINI, G., et al. Positron Emission Tomography Detection of Metastatic Penile Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Urology* (2001); 165:1633-1634.
  104. REES, R.W., et al. pT2 penile squamous cell carcinomas: cavernosus vs. spongiosus invasion. *Eur Urol* (2008); 7:111

105. ROHREN, E.M., et al. Clinical applications of PET in oncology. *Radiology* (2004); 231:305-332
106. RUBIN, M.A., et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: Evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* (2001); 159:1211–1218
107. SALAZAR, A., et al. 18F-FDG PET/CT as a prognostic factor in penile cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019 Apr;46(4):855-863.
108. SANCHEZ, D.F., et al. Pathological factors, behavior, and histological prognostic risk groups in subtypes of penile squamous cell carcinomas (SCC). *Semin Diagn Pathol*. 2015 May;32(3):222-31
109. SANAIEI, M., et al. Investigation of the Effect of 5-Aza-2'-Deoxycytidine on p15INK4, p16INK4, p18INK4, and p19INK4 Genes Expression, Cell Growth Inhibition, and Apoptosis Induction in Hepatocellular Carcinoma PLC/PRF/5 Cell Line. *Adv Biomed Res*. 2020 Jul 31;9:33. doi: 10.4103/abr.abr\_68\_20. PMID: 33072645; PMCID: PMC7532824.
110. SCHER, B., et al. 18F-FDG PET/CT for Staging of Penile Cancer. *J Nucl Med*. 2005 Sep;46(9):1460-5.
111. SCHLENKER, B., et al. Detection of inguinal lymph node involvement in penile squamous cell carcinoma by 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT: A prospective single-center study. *Urol Oncol*. 2012 Jan-Feb;30(1):55-9.
112. SHILI, X., et al. Hexokinase 2 Is Targetable for HK1 Negative, HK2 Positive Tumors from a Wide Variety of Tissues of Origin *J Nuc Med* 2018 Jun 7. pii: jnumed.118.212365.
113. SHUAI, L., et al. 18F-FDG PET/CT can predict chemosensitivity and proliferation of epithelial ovarian cancer via SUVmax value. *Jpn J Radiol*. 2018 Sep;36(9):544-550.
114. SOUILLAC, I., et al. Prospective evaluation of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography- computerized tomography to assess inguinal lymph node status in invasive squamous cell carcinoma of the penis. *J Urol*, 2012. 187: 493.
115. SUROV, A., et al. Standardized Uptake Values Derived from <sup>18</sup>F-FDG PET May Predict Lung Cancer Microvessel Density and Expression of KI 67, VEGF, and HIF-1 $\alpha$  but Not Expression of Cyclin D1, PCNA, EGFR, PD L1, and p53. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018 Jun 6;2018:9257929.

116. TER-POGOSSIAN, M.M., et al. A Positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). *Radiology* (1975); 114:89-98.
117. TONG, S.Y., et al. Correlation Between FDG Uptake by PET/CT and the Expressions of Glucose Transporter Type 1 and Hexokinase II in Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 May;22(4):654-8.
118. VARGHESE F., et al. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*. 2014 May 6;9(5).
119. VEERATTERAPILLAY, R., et al. Oncologic Outcomes of Penile Cancer Treatment at a UK Supraregional Center. *Urology*, 2015. 85: 1097.
120. VELAZQUEZ, E.F., et al. Sarcomatoid carcinoma of the penis: a clinicopathologic study of 15 cases. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1152–8.
121. VELAZQUEZ, E.F., et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. *Am J Surg Pathol* 2008;32:974–9.
122. VIEIRA, C.B., et al. Profile of patients with penile cancer in the region with the highest worldwide incidence. *Sci Rep*. 2020;10:2965
123. VRIES, H.M., et al. Recent developments in penile cancer imaging. *Curr Opin Urol*. 2019 Mar;29(2):150-155
124. WANG, L., et al. Prognostic significance of p53 expression in patients with esophageal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2016; 16:373
125. WARBURG, O., On respiratory impairment in cancer cells. *Science* (1956); 124:269-270.
126. WARBURG, O., et al. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*. 1927; 8(6):519–530.
127. WATANABE, Y., et al. <sup>18</sup>F-FDG uptake in primary gastric malignant lymphoma correlates with glucose transporter 1 expression and histologic malignant potential. 2013. *Int J Hematol* 97, 43–49.
128. WEBER, G., et al. Enzymology of cancer cells. *N Engl J Med*. 1977. 296, 486 – 493.
129. WEIN, A.J., et al. (2016). *Campbell-Walsh urology* (11th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.

130. WILSON, J.E., et al. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol.* 2003;206:2049–2057
131. YEN, T.C., et al. <sup>18</sup>F-FDG uptake in squamous cell carcinoma of the cervix is correlated with glucose transporter 1 expression. 2014 .*J Nucl Med* 45, 22–29.
132. ZEKAN, D.S., et al. Prognostic predictors of lymph node metastasis in penile cancer: a systematic review. *Int Braz J Urol.* 2021 Sep-Oct;47(5):943-956.
133. ZHAO, Z., et al. 18F-FES and 18F-FDG PET for differential diagnosis and quantitative evaluation of mesenchymal uterine tumors: correlation with immunohistochemical analysis. *J Nucl Med.* 2013; 54:499–506
134. ZHU, A., et al. Metabolic PET imaging in cancer detection and therapy response. 2011. *Semin Oncol* 38, 55–69.
135. ZHU, Y., et al. Development and evaluation of a nomogram to predict inguinal lymph node metastasis in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes. *J Urol.* 2010; 184:539-345.
136. ZHU, Y., et al. Predicting pelvic lymph node metastases in penile cancer patients: a comparison of computed tomography, Cloquet's node, and disease burden of inguinal lymph nodes. *Onkologie*, 2008. 31: 37
137. ZITO, M.F., et al. Discrepancy of p16 immunohistochemical expression and HPV RNA in penile cancer. A multiplex in situ hybridization/immunohistochemistry approach study. *Infect Agent Cancer.* 2021 Mar 31;16(1):22.
138. ZOU, Z.J., et al. Radiocolloid-based dynamic sentinel lymph node biopsy in penile cancer with clinically negative inguinal lymph node: an updated systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol*, 2016. 48: 2000.

## 5- ANEXOS

### ANEXO I - Tabela TNM 2017 - Classificação clínica e patológica do câncer de pênis e Estadiamento tumoral

#### Classificação Clínica (cTNM)

##### T - Tumor Primário

TX Tumor primário não pode ser avaliado

T0 Sem evidência de tumor primário

Tis Carcinoma *in situ*

Ta Carcinoma não invasivo verrucoso

T1 Tumor invade o tecido conectivo subepitelial

T1a Tumor invade o tecido conectivo subepitelial sem invasão linfocelular e não é pouco diferenciado ou indiferenciado

T1b Tumor invade o tecido conectivo subepitelial com invasão linfocelular ou é pouco diferenciado ou indiferenciado

T2 Tumor invade o corpo esponjoso com ou sem invasão da uretra

T3 Tumor invade o corpo cavernoso com ou sem invasão da uretra

T4 Tumor invade estruturas adjacentes

##### cN – Linfonodos regionais

cNx Linfonodos regionais não podem ser avaliados

cN0 Linfonodos inguinais não palpáveis ou sem sinais de aumento

cN1 Linfonodo inguinal palpável unilateral

cN2 Múltiplos linfonodos inguinais palpáveis unilateral ou linfonodos inguinais palpáveis bilateral

cN3 Massa linfonodal inguinal fixa ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral

##### M - Metastases à distância

M0 Sem metástases à distância

M1 Com metástases à distância

#### Classificação clínica

A categoria pT corresponde à categoria cT. A categoria pN é baseada na biópsia linfonodal ou à excisão cirúrgica dos linfonodos.

##### pN – Linfonodos regionais

pNx Linfonodos regionais não podem ser avaliados

- pN0 Linfonodos regionais sem metástases
- pN1 Metástase intra nodal em um ou dois linfonodos inguinais
- pN2 Metástases em mais de dois linfonodos inguinais bilaterais ou em linfonodos inguinais bilaterais
- pN3 Metástases em linfonodo(s) pélvico unilateral ou bilateral ou extensão extra nodal em qualquer metástase de linfonodo regional

**pM - Metástases à distância**

- pM0 Sem metástases à distância
- pM1 Com metástases à distância microscopicamente confirmada

**G – Graduação Histopatológica**

- GX Grau de diferenciação não pode ser avaliado
- G1 Bem diferenciado
- G2 Moderadamente diferenciado
- G3-4 Pouco diferenciado/indiferenciado

## ANEXO II - Parecer do COEP-UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Papel do PET/CT com 18F-FDG nos pacientes com câncer de pênis

**Pesquisador:** Marcelo Henrique Mamede Lewer

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 10783912.9.0000.5149

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA ((UFMG))

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 179.121

**Data da Relatoria:** 19/12/2012

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo prospectivo, observacional, com uma casuística consecutiva de 50 pacientes com câncer de pênis do HC e do Hospital Luxemburgo do Instituto Mário Penna (IMP). Os pacientes serão avaliados quanto à extensão da doença por meio de exames clínico, laboratoriais e de imagem convencionais rotineiramente solicitados no estadiamento pré-operatório. Serão, também, submetidos ao estudo com tomografia por emissão de pósitrons (PET), utilizando o radiotraçador análogo da glicose (18F-FDG). As amostras tumorais serão coletadas durante a ressecção cirúrgica do tumor e armazenadas em RNAlatter (-80o). As extrações de RNAs serão realizadas em todos os fragmentos coletados para determinação de potenciais marcadores moleculares preditores de prognóstico oncológico, definidos no projeto. Os participantes da pesquisa serão maiores de 18 anos de idade, acompanhados nos Ambulatórios de Urologia do HC/UFMG e no Hospital Luxemburgo do IMP, com diagnóstico histopatológico de câncer de pênis e que serão submetidos a tratamento cirúrgico. "Todos os pacientes devem ter estado de desempenho de 0 a 2 (de acordo com a classificação ECOG), com função cardíaca normal (ausência de arritmias graves ou alterações isquêmicas graves detectadas por eletrocardiograma), com capacidade de entender, disposição em assinar um Consentimento Livre e Esclarecido por escrito e de cumprir o cronograma de visitas." Há critérios definidos de exclusão, cronograma adequado e é afirmado que o custo será de dez mil reais, com financiamento próprio, segundo o projeto, e por financiamento do "INCT-Medicina Nuclear", segundo o projeto no formulário antigo do COEP. Trata-se de um projeto de doutorado.

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** 3134-0945

**Fax:** 3134-0945

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos primários são: 1- Verificar o papel do 18F-FDG PET/CT no estadiamento de pacientes com câncer de pênis (CP) confirmado histopatologicamente e encaminhado ao tratamento cirúrgico; 2- Avaliar a sobrevida livre de doença dos pacientes através da imagem molecular do PET/CT, utilizando o radiotraçador análogo da glicose (18F-FDG); 3- Correlacionar os achados cirúrgicos, histopatológicos e genéticos dos tumores primários com os de imagem molecular do PET/CT para determinação de marcadores prognósticos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores "Até o momento, não há relato de mortalidade com a realização de estudos de PET. Os riscos que podem ocorrer ao participar do estudo estão relacionados ao uso do FDG, assim como, ao uso de radiação emitida pelo F-18. Como o FDG é uma droga semelhante à existente no nosso organismo, até o momento, não se observou nenhum efeito adverso. Com relação aos riscos relacionados ao uso do F-18, a radiação recebida é semelhante à radiação utilizada nos estudos de tomografia computadorizada. Ou seja, os valores estão dentro de um limite aceitável."

"Quanto aos benefícios, os resultados deste estudo poderão permitir aprimorar a abordagem cirúrgica dos pacientes e a identificar biomarcadores para auxiliar na compreensão da biologia tumoral e do prognóstico oncológico dos pacientes com câncer de pênis no pré-operatório do tratamento dessas neoplasias."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O câncer de pênis apresenta alta prevalência e morbidade nos países em desenvolvimento. Sua etiopatogenia é pouco conhecida. A investigação por métodos de imagem outros (além da ultrassonografia e da tomografia computadorizada) e o conhecimento de marcadores tumorais poderão trazer mais conhecimentos sobre a doença e permitir uma melhor abordagem desses pacientes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram anexados o projeto de pesquisa (na Plataforma Brasil e no antigo modelo do COEP, com a assinatura de sete pesquisadores), a carta de anuência do Instituto Mário Penna, o parecer consubstanciado do Departamento de Anatomia e Imagem, a folha de rosto devidamente preenchida e assinada e o registro na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do HC. O TCLE está em forma de convite, total de três páginas, com descrição detalhada da metodologia, em linguagem adequada, preservando os direitos dos participantes da pesquisa, com seus riscos e benefícios. Há um local para assinatura de testemunha, "se necessário."

**Recomendações:**

Não é necessário o local para assinatura da testemunha.

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** 3134-0945 **Fax:** 3134-0945 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está adequado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 20 de Dezembro de 2012

---

**Assinador por:**  
**Maria Teresa Marques Amaral**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** 3134-0945 **Fax:** 3134-0945 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

### ANEXO III – Tabela dos testes de normalidade das variáveis contínuas analisadas

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Idade	,131	45	,051	,971	45	,308
Ki67	,196	45	,000	,906	45	,001
pSUVbw	,102	45	,200*	,961	45	,132
pSUVm_2SD	,117	45	,146	,964	45	,171

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction