

AVALIAÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO- MESÊNQUIMA NO CARCINOMA DE PÊNIS

MARIA JOSÉ LEONARDO SOUZA

**Tese apresentada à Fundação Antonio Prudente
para obtenção do Título de Doutora em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Souza, Maria José Leonardo

Avaliação da transição epitélio-mesênquima no carcinoma de pênis / Maria José Leonardo Souza, 2011.

99p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1. CÂNCER DE PÊNIS. 2. EPITÉLIO. 3. MESÊNQUIMA. 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 5. CADERINA-E. 6. VIMENTINA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Deonizio Leonardo e Maria Rodrigues Leonardo, pelo amor e dedicação durante toda a minha vida.

Aos meus filhos,

Dalci, Maíra, Larissa e Pedro Lucas, pelo amor de forma incondicional. Amo vocês.

A toda minha família,

pelo apoio e ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido,

Edinizio, pelo apoio, carinho e compreensão.

Aos profissionais do Hospital do Câncer de São Paulo,

por cuidarem de tantas pessoas dando esperança diante de uma doença tão triste - o câncer.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, meu orientador, pela oportunidade de ser sua aluna e pesquisadora nesta instituição durante esses quatro anos. Por compartilhar momentos de sabedoria e despertar a curiosidade na pesquisa em câncer, sendo responsável pela finalização do trabalho.

Ao Professor Dr. Ademar Lopes, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo, meu co-orientador, pelo exemplo a ser seguido e pelos ensinamentos na área de sarcomas.

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo, pela disponibilidade e colaboração com as análises estatísticas.

Ao Dr. Rafael Malagoli Rocha, Biomédico do Departamento de Anatomia Patológica, pela disponibilidade e colaboração com as reações da imuno-histoquímica.

Aos professores da pós-graduação da Fundação Antonio Prudente: Dr. Luiz Fernando Lima Reis, Dra. Vilma Martins e Prof. Dr. Roger Chammas, pelos ensinamentos na área de Biologia Molecular.

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Dra. Maria Dirlei Ferreira Souza Berganani, Dra. Isabela Werneck da Cunha, Dr. Gilles Landman, Dr. Antônio Hugo José Froes de Marques Campos, pelos ensinamentos na área de Patologia dos Tumores.

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski, pelos ensinamentos na área de cabeça e pescoço.

Dr. José Humberto Fregnani, pelos ensinamentos da área de estatística.

Prof. Dr. Roger Chammas, pelos ensinamentos na área de inflamação e câncer.

Às minhas grandes amigas:

Marcilei Buim, que me acolheu no laboratório de pesquisa colaborando em todos os momentos da realização da tese.

Alice Muglia, sempre pronta para colaborar com os colegas.

Giannina Ricci, minha comadre, pelo apoio de tantos anos de amizade.

Ana Lira, grande amiga de longa data, pelo incentivo.

A elas dedico a belíssima canção de Milton Nascimento “Canção da América - amigo é coisa pra se guardar, do lado esquerdo do peito”

A Mariana Ikoma, minha querida aluna por dedicar tanto tempo me ajudando nas reações de imuno-histoquímica.

Aos colegas do CIPE - Centro Internacional de Pesquisa em Câncer: Dra. Claudia Malheiros, Dra. Fernanda Ayala, Gilmara Silva, Lígia Oliveira, Mérin Bárbara, Renata Carolina Fraga Yanez, Rodrigo Crespo, pela amizade.

As colegas da Pós-Graduação: Juliana Bartolo, Luciana Mejia, Juliana Godoy Portas, Luiz Guidoni, Zé Fernando, Luiz Alberto, pela amizade durante esses anos que passamos juntos.

Aos funcionários dos laboratórios de apoio à pesquisa do Hospital A.C. Camargo:

Laboratório de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, José Ivanildo Neves, Maria Nazaré de Fátima Ferreira e Simone Cristina Pagoti, pelo apoio e colaboração.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Investigativa Carlos Ferreira Nascimento e Severino da Silva Ferreira, pelo preparo das lâminas de imuno-histoquímica com competência, obrigada pela colaboração.

Ao Rômulo, do laboratório de TMA, pela colaboração e boa vontade.

Aos funcionários do laboratório de técnicas tradicionais, pela colaboração.

Aos funcionários da Biblioteca do Hospital AC Camargo, representados por Suely Francisco, pela disponibilidade e ajuda em todas as fases da elaboração deste trabalho e pelo atendimento prestado com tanta competência.

À equipe da Pós-Graduação: Ana Maria Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza Barros pela competência e dedicação, por estarem sempre nos colocando a par dos assuntos que envolvem a pós-graduação.

Aos colegas professores da UNINOVE, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Mauricio Pedro pela revisão do português.

RESUMO

Souza MJL. **Avaliação da transição epitélio-mesênquima no carcinoma de pênis.** São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer de pênis é uma doença rara em países desenvolvidos. No Brasil, é considerado um grave problema de saúde. A metástase para linfonodos é o principal fator prognóstico, porém há falhas na avaliação clínica e laboratorial. Portanto a busca por estudos com marcadores moleculares são alvo de estudos em cancer de pênis. A transição epitélio-mesênquima (EMT) é um fenômeno comum a todos os tumores epiteliais e faz parte do modo como as células neoplásicas se comportam para invadirem o estroma adjacente. Analisar o fenômeno EMT, através da expressão imuno-histoquímica (IHQ) de e-caderina (ECAD) e da vimentina, e sua correlação com os fatores clínico-patológicos prognósticos conhecidos em carcinoma de pênis foram nossos objetivos. **Material e Métodos:** 91 casos de pacientes sem história de neoplasia e 151 casos de pacientes portadores de carcinoma de pênis foram submetidos à imuno-histoquímica para análise da expressão de ECAD na Mucosa não-neoplásica (MNN), na Porção Superficial e Central do Tumor (TPSC) e no Fronte de Invasão Tumoral (TFI); para a avaliação da expressão de vimentina foi considerada a marcação citoplasmática da célula neoplásica, localizada na borda infiltrativa dos tumores de acordo com intensidade e porcentagem de células marcadas. **Resultados:** A perda da expressão da ECAD foi significativamente maior no TFI comparado com a TPSC e com a MNN adjacente. A perda da ECAD se correlacionou no TFI com grau histológico ($p<0,0001$), com o padrão infiltrativo ($p=0,0003$), com a metástase linfonodal ($p=0,0067$), com a invasão perineural ($p=0,0284$) e com a invasão vascular ($p=0,0425$). Na TPSC houve associação da ECAD com o padrão infiltrativo ($p=0,0116$) e com a invasão perineural ($p=0,0225$). A vimentina se associou com o grau histológico ($p<0,0001$), com o padrão infiltrativo ($p<0,0001$), com o estadio T ($p=0,0001$), com a metástase linfonodal ($p<0,0001$), com a invasão perineural ($p=0,0246$) e com a invasão vascular ($p=0,0003$). Os fatores prognósticos independentes estimados pelo modelo de regressão de Cox,

para câncer específica, foram a expressão positiva da vimentina (RR=7.676; IC 95% [3.210-18,346]) e presença de metástase linfonodal (RR=2,761; IC 95% [1,320-5,774]). Para óbitos em geral, os fatores prognósticos independentes foram a expressão positiva da vimentina (RR=2,302; IC 95% [1,405-3,772]), presença de metástase linfonodal (RR=2,370; IC 95% [1,366-4,113]) e a presença de invasão perineural (RR= 1,841; IC% [1,073-3,158]). **Conclusões:** A perda da expressão da ECAD ocorre com maior frequência no fronte de invasão tumoral e está associada com os fatores clássicos de mau prognóstico como os tumores poucos diferenciados, de padrão infiltrativo, com metástase linfonodal, com invasão perineural e invasão angiolinfática e piores sobrevida câncer específica e global. O fenótipo de EMT definido como a perda da expressão de ECAD e ganho de vimentina é associado com todos os fatores de mau prognóstico, incluindo piores sobrevidas global e câncer específica.

SUMMARY

Souza MJL. [Avaliation of epithelial mesenchymal transition in penile carcinoma]. São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Penile cancer is a rare disease in developed countries. In Brazil, it is considered a serious health problem. Lymph nodes metastasis is the main prognostic factor; however, clinical and laboratorial evaluations of it are still unreliable. Therefore, molecular markers have been pursued. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a common phenomenon in carcinomas and it is part of the mechanism through which tumor cells behave to invade the adjacent stroma. The aim of this study was to analyze EMT phenomenon through e-cadherin (ECAD) and vimentin expression pattern using immunohistochemistry, and correlate those findings with known clinico-pathological features and survival of penile carcinoma patients.

Material and Methods: 91 samples of patients with no history of cancer and 151 samples of penile carcinoma were submitted to immunohistochemistry for ECAD expression in the non-neoplastic mucosa (NNM), superficial central portion of tumors (SCPT) and in the tumor invasion front (TIF); vimentin expression was evaluated regarding the intensity of cytoplasmatic staining and percentage of stained neoplastic cells. **Results:** Loss of ECAD expression in the TIF is significantly higher than in SCPT or in adjacent MNN. Also, the loss of ECAD expression in the TIF correlated with histological grade ($p<0,0001$), infiltrative pattern of tumor growth ($p=0,0003$), lymph nodes metastasis ($p=0,0067$), perineural invasion ($p=0,0284$) and vascular invasion ($p=0,0425$). In SCPT, loss of ECAD expression associated with infiltrative growth ($p=0,0116$) and perineural invasion ($p=0,0225$). Vimentin expression is associated with histological grade ($p<0,0001$), infiltrative growth ($p<0,0001$), T stage ($p=0,0001$), lymph nodes metastasis ($p<0,0001$), perineural, invasion ($p=0,0246$) and vascular invasion ($p=0,0003$). Independent prognostic risk factors for cancer specific survival estimated by Cox regression were gain of vimentin expression (RR=7.676; IC 95% [3.210-18,346]) and presence of lymph nodes metastasis (RR=2,761; IC 95% [1,320-5,774]). For death not due to

cancer, independent prognostic factors were expression of vimentin (RR=2,302; IC 95% [1,405-3,772]), presence of lymph nodes metastasis (2,370; IC 95% [1,366-4,113]), and perineural invasion (RR= 1,841; IC% [1,073-3,158]). **Conclusions:** Loss of ECAD expression is more frequent in tumor invasion front and it is associated with classical poor prognostic indicators such as poorly differentiated tumors, infiltrative pattern of tumor growth, perineural and vascular invasion. EMT phenotype defined by loss of ECAD and gain of vimentin expression is associated with all poor prognostic factors, including worse cancer specific and overall survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	EMT: Modificação de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal.....	8
Figura 2	EMT do tipo 3 contribuição da EMT para a progressão tumoral.....	11
Figura 3	Processos EMT e MET na metastatização dos tumores.....	11
Figura 4	Distribuição dos pacientes com carcinoma de pênis de acordo com a Idade.....	25
Figura 5	Representação da reação de imuno-histoquímica, mostrando expressão positiva da ECAD na MNN de forma homogênea e forte.....	33
Figura 6	Representação da reação de imuno-histoquímica com expressão forte de ECAD no tumor de forma difusa.....	34
Figura 7	Representação da reação de imuno-histoquímica com expressão fraca de ECAD no tumor, quando comparada com a mucosa não-neoplásica de revestimento.....	35
Figura 8	Representação da reação de imuno-histoquímica com expressão de ECAD no tumor e no FTI os pequenos blocos decorrentes da perda da expressão.....	36
Figura 9	Representação da reação de imuno-histoquímica em detalhe mostrando a perda de expressão de ECAD nos pequenos blocos.....	36

Figura 10	Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando a perda de expressão de ECAD nos pequenos blocos infiltrativos e a expressão de ECAD forte no bloco terminal maior.....	37
Figura 11	Comparação dos valores descritivos de perda de ECAD (células negativas) na MNN e TFI em amostras de CP.....	39
Figura 12	Comparação entre os valores descritivos da expressão positiva de ECAD (2/3+) na MNN e TFI em amostras de CP.....	40
Figura 13	Caracterização entre o grau de diferenciação histológica e expressão de ECAD no tumor na TPSC.....	42
Figura 14	Caracterização entre grau de diferenciação histológica e expressão de ECAD no TFI.....	43
Figura 15	Caracterização do padrão de infiltração e expressão de ECAD na TPSC.....	44
Figura 16	Caracterização entre padrão de infiltração e expressão de ECAD no TFI.....	46
Figura 17	Caracterização entre estadio T e expressão de ECAD na TPSC.....	47
Figura 18	Caracterização entre estadio T e expressão de ECAD no TFI.....	48
Figura 19	Caracterização entre metástase nos linfonodos e expressão de ECAD na TPSC.....	49
Figura 20	Caracterização entre metástase nos linfonodos e expressão de ECAD no TFI.....	50

Figura 21	Caracterização de invasão perineural e expressão de ECAD na TPSC.....	51
Figura 22	Caracterização de invasão perineural e expressão de ECAD no TFI.....	52
Figura 23	Caracterização de invasão vascular e expressão de ECAD na TPSC.....	53
Figura 24	Caracterização de invasão vascular e expressão de ECAD no TFI.....	54
Figura 25	Caracterização do grau de diferenciação histológica e expressão de vimentina.....	57
Figura 26	Caracterização entre o padrão de infiltração e expressão de vimentina.....	58
Figura 27	Caracterização entre estadio T e expressão de vimentina.....	60
Figura 28	Caracterização do status linfonodal e expressão de vimentina.....	61
Figura 29	Caracterização de invasão perineural e expressão de vimentina.....	62
Figura 30	Caracterização entre invasão vascular e expressão de vimentina.....	63
Figura 31	Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando expressão positiva para vimentina em células neoplásicas de CP.....	64
Figura 32	Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando expressão de vimentina em células isoladas de CP.....	64
Figura 33	Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando expressão negativa de vimentina em CP.....	65

Figura 34	Curvas de sobrevida câncer específica de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD na TPSC.....	66
Figura 35	Curvas de sobrevida câncer específica de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD no TFI.....	66
Figura 36	Curva de sobrevida global de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD na TPSC.....	68
Figura 37	Curva de sobrevida global de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD no TFI.....	68
Figura 38	Curva de sobrevida livre de doença de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD na TPSC.....	69
Figura 39	Curva de sobrevida livre de doença de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD no TFI.....	70
Figura 40	Curvas de sobrevida global em 10 anos de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína vimentina.....	71
Figura 41	Curvas de sobrevida câncer específica em 10 anos de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína vimentina.....	71
Figura 42	Curvas de sobrevida livre de doença em 10 anos de pacientes portadores CP em relação à expressão da vimentina.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostra de acordo com os parâmetros clínico-patológicos estudados.....	26
Tabela 2	Informações sobre os anticorpos e os dados das reações utilizados no presente estudo.....	27
Tabela 3	Comparação entre a variação da expressão de ECAD na MNN na TPSC e no TFI.....	38
Tabela 4	Associação entre variáveis clínico-patológicas e a expressão da proteína ECAD no TPSC e no fronte de invasão dos carcinomas de pênis.....	45
Tabela 5	Associação entre variáveis clínico-patológicas e a expressão da proteína ECAD na TPSC e no TFI agrupada, como expressão normal e perda discreta versus perda intensa.....	55
Tabela 6	Associação entre variáveis clínico-patológicas e a expressão da proteína vimentina nos carcinomas de pênis.....	59
Tabela 7	Risco relativo para óbito específico e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) estimados pelo modelo de regressão de COX.....	72
Tabela 8	Risco relativo para óbito global e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) estimados pelo modelo de regressão de COX.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	Do inglês, <i>American Joint Comittee on Cancer</i>
α-SMA	Do inglês, Alpha-smooth muscle actin
CDH1	<i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
CP	Carcinoma de Pênis
DAB	Diaminobenzindine
ECAD	Proteína E-caderina
EGFR	Do inglês, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Do inglês, <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPN	Invasão perineural
HE	Hematoxilina/eosina
HPV	Do inglês, <i>Human Papillomavirus</i>
MDCK	Do inglês, <i>maden-darby canine kidney</i>
MET	Do inglês, <i>mesenchymal- epithelial transition</i>
MNN	Mucosa não-neoplásica
MNN-PT	Pacientes sem história de doença neoplásica
MNN-TU	Mucosa à distância do tumor e sem alterações morfológicas
MIB-1	Do inglês, <i>Mindbomb homolog 1</i>
MMP	Do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NCAD	Proteína N-caderina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Do inglês, phosphate buffered saline
PCAD	Proteína Pan-caderina
PCNA	Do inglês, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
RR	Riscos relativos
SCE	Sobrevida câncer específica
SG	Sobrevida global
SLUG	Do inglês, Zinc finger protein SNAI2 ou Protein snail homolog 2

SNAIL	Do inglês, Zinc finger protein ou Protein snail homolog 1
SPSS	Do inglês, Statistical Package for Social Science
TFI	Tumor fronte de invasão
TMA	Do inglês, <i>Tissue Microarray</i>
TNM	Estadio do tumor primário (T), presença de linfonodos positivos (N) e metástase (M)
TPSC	Tumor porção superficial e central

INDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Carcinoma de Pênis.....	1
1.2	Transição epitélio-mesênquima	7
1.2.1	E-caderina	12
1.2.2	Vimentina.....	16
1.3	Considerações finais	18
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Casuística	21
3.1.1	CrITÉRIOS de inclusão.....	22
3.1.2	CrITÉRIOS de exclusão.....	22
3.1.3	Exame anatomo-patológico.....	22
3.1.4	Caracterização da amostra	24
3.2	Imuno-istoquímica (IHQ)	27
3.3	Interpretação das reações de imuno-histoquímica	29
3.4	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Expressão de ECAD.....	32
4.1.1	Expressão de ECAD nas mucosas não-neoplásicas.....	32
4.1.2	Expressão de ECAD na porção superficial e central do tumor.....	34
4.1.3	Expressão de ECAD no fronte de invasão do tumor	35
4.1.4	Comparação entre os grupos MNN, TPSC e TFI	37
4.2	Associações entre a expressão de ECAD e parâmetros clínico-patológicos	41

4.3	Associações entre a expressão de vimentina e parâmetros clínico-patológico.....	56
4.4	Análise da sobrevida	65
4.4.1	Análise univariada.....	65
4.4.2	Curvas de sobrevida de acordo com a expressão de ECAD65	65
4.4.3	Curvas de sobrevida de acordo com a expressão de vimentina	70
4.5	Análise multivariada	72
4.5.1	Sobrevida câncer específica	72
4.5.2	Sobrevida global	73
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÕES.....	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ANEXOS

Anexo 1 Classificação histológica OMS, 2004.

Anexo 2 Sistema de classificação do tumor de pênis – TNM, AJCC, 2010.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE PÊNIS

O carcinoma de pênis (CP) é uma doença rara em nações desenvolvidas, correspondendo de 0,4% a 0,6% de todas as neoplasias malignas (GLOECKLER-RIES et al. 1990). Nos países em desenvolvimento é um problema importante de saúde (PARKIN et al. 1997; MISRA et al. 2004; FAVORITO et al. 2008; SALVIONI et al. 2009). Em algumas regiões da África, Ásia e América do Sul chega a corresponder a até 20% das neoplasias malignas no homem (RAJU et al. 1985). A maior incidência dessa neoplasia é nas regiões de Barshi, Paranda e Bhum, na Índia (3,32/100.000 habitantes) e os menores índices encontram-se entre os judeus nascidos em Israel e nos Estados Unidos (0/100.000 e 0,07/100.000, respectivamente), (VATANASAPT et al. 1995; SALVIONI et al. 2009).

O aumento da incidência ocorre a partir da sexta década de vida (DERRICK et al. 1973; GURSEL et al. 1973). Este tumor é infrequente em adultos abaixo de 30 anos, sendo raramente descrito em crianças (DEAN 1935; NARASIMHARAO et al. 1985; FICARRA et al. 2006).

No Brasil, dentre as neoplasias malignas do homem, o CP corresponde a aproximadamente 2,1%, sendo a incidência maior nas regiões Norte e Nordeste, onde as condições socioeconômicas são piores (BRUMINI et al. 1982). Entre 2006 e 2007, a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) realizou um estudo epidemiológico e relatou que em algumas regiões de maior incidência o CP corresponde a

aproximadamente 2,9% a 6,8% casos/100.000 habitantes. Nessas regiões de maior ocorrência, o câncer de pênis supera os casos de cânceres de próstata e bexiga (FAVORITO et al. 2008; Ministério da Saúde 2009). As estimativas de câncer publicadas pelo Ministério da Saúde para 2010 não apontavam o câncer de pênis como um dos mais freqüentes (Ministério da Saúde 2009). Este tipo de câncer parece não ter distinção entre as etnias negra e branca quando se compara nível social semelhante, apesar desse estudo relatar o maior número dessa neoplasia em brancos (FAVORITO et al. 2008).

A doença causa grande impacto psicológico na vida do paciente. A questão da identidade sexual e a baixa qualidade de vida ou a diminuição do seu bem-estar são alguns dos efeitos negativos. Os pacientes também podem apresentar distúrbios psiquiátricos (MADDINENI et al. 2009). Um estudo realizado por BARROS e MELO (2009), no Hospital do Câncer de Pernambuco, concluiu que as principais consequências verbalizadas pelos homens, algumas de natureza emocional, foram insônia, idéia de suicídio, medo e tristeza intensa.

Os fatores para o desenvolvimento do CP são a presença de fimose, as más condições de higiene, o baixo padrão socioeconômico, os efeitos crônicos e irritativos da pele, o número de parceiros sexuais, o histórico de doenças venéreas, infecção pelo papilomavírus humano (HPV do inglês *Human papillomavirus*), o uso de tabaco, radiação ultravioleta, líquen crônico e balanite xerótica obliterante (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; VILLA e LOPES 1986; BRINTON et al. 1991; DALING et al. 2005; BLEEKER et al. 2009; GUIMARÃES et al. 2011). As populações com melhor nível socioeconômico e cultural, nas quais são realizadas uma higiene adequada, apresentam baixos índices de desenvolvimento dessa

neoplasia (VILLA e LOPES 1986; HELLBERG et al. 1987; BRINTON et al. 1991; ROSEMBERG et al. 1991; DALING et al. 2005; BLEEKER et al. 2009).

A presença do HPV em carcinomas de pênis foi demonstrada pela primeira vez no Brasil na década de 1980 (VILLA e LOPES 1986), e foi associada com o aumento da expressão da proteína p53 e com pior prognóstico para os pacientes (BEZERRA et al. 2001a).

O HPV afeta o epitélio escamoso da genitália masculina da mesma forma que a feminina, incluindo a formação de condilomas e a transformação neoplásica (SARKAR et al. 1992). Os HPVs 6 e 11, são os mais comumente associados a lesões não displásicas, como verrugas genitais, podendo ser encontrados no carcinoma verrucoso; enquanto os tipos 16, 18, 31 e 33 entre outros são associados com carcinoma *in situ* e invasivo (WIENER e WALTHER 1995). O HPV 16 é o mais freqüentemente detectado na lesão primária tendo sido também descrito nas lesões metastáticas (VILLA e LOPES 1986; VARMA et al. 1991; TORNESELLO et al. 2008).

A relação entre o hábito de fumar e o carcinoma de pênis não está bem estabelecida, apesar de alguns trabalhos evidenciarem o risco aumentado entre os fumantes (HELLBERG et al. 1987; HARISH e RAVI 1995). O uso do tabaco também tem sido apontado como um fator etiológico (HELLBERG et al. 1987; MADEN et al. 1993; HARISH e RAVI 1995), ratificando ainda mais a hipótese de que o fumo causa câncer em todo epitélio malphigiano, independentemente do contato direto da droga com o tecido. Há indícios, inclusive, de que se trata de um fator dose dependente (TSEN et al. 2001), embora essa relação seja inconsistente, carecendo ainda de melhores estudos.

A circuncisão é um importante fator de proteção contra o desenvolvimento do CP (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; JOHNSON et al. 1973; FREW et al. 1976; FRISCH et al. 1995). Aspectos religiosos e culturais referentes à realização de postectomia na criança desempenham papel fundamental na incidência desta neoplasia, assim como a idade em que ela é realizada (JOHNSON et al. 1973; FREW et al. 1976). Nos judeus postectomizados logo após o nascimento, a incidência de CP é nula. Na Índia, nos mulçumanos que são operados entre os 3 e 12 anos de idade a frequência é de 0,15%, enquanto nos hindus não-operados a frequência chega a 3,1% (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967).

A maioria das neoplasias malignas de pênis é constituída por carcinomas - correspondendo a mais de 95% dos casos -, derivados do epitélio estratificado, tanto da glândula como do sulco coronal e prepúcio. Os carcinomas epidermóides usuais constituem o grupo mais comum (FRALEY et al. 1989; HORENBLAS et al. 1993; VELAZQUEZ et al. 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (EBLE et al. 2004), lançou uma classificação histopatológica dos carcinomas de pênis, na qual se destacam uma grande variedade de subtipos tais como os carcinomas basalóides, as variantes verrucosas (Warty, papilífero, *cuniculatum*), e os carcinomas sarcomatóides (CUBILLA et al. 2001; GUIMARÃES et al. 2009). Recentemente descrito, o carcinoma acantolítico (CUNHA et al. 2009). Outros tipos histológicos são os melanomas e os sarcomas. Esta classificação pode ser observada no Anexo 1. A definição do subtipo histológico tem papel importante no prognóstico e está relacionado ao envolvimento de metástases linfonodais e óbito (GUIMARÃES et al. 2009).

Além da classificação histológica, outras variáveis são consideradas importantes no carcinoma de pênis, entre elas, o grau de diferenciação histológica considerado valor preditivo de comprometimento linfonodal e sobrevida global. Os tumores são classificados em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (VELAZQUEZ et al. 2008). Tumores pouco diferenciados apresentam risco maior de desenvolvimento de metástases (FICARRA et al. 2002; CHAUX et al. 2009a; CUNHA et al. 2009).

O padrão de invasão tumoral é outra variável relacionada a um pior prognóstico. Estudos demonstraram que tumores com padrão de crescimento infiltrativo, invadindo o estroma em grupos pequenos de células, têm maior risco de embolização linfática do que tumores com padrão de crescimento exofítico, nos quais a invasão ocorre em grandes grupos de células, mantendo uma interface tumor-hospedeiro bem definida (GUIMARÃES et al. 2006).

A invasão perineural também se associa a um pior prognóstico e está relacionado ao comportamento biológico do tumor (CUBILLA et al. 2007; VELAZQUEZ et al. 2008).

O sistema de classificação TNM, outra variável importante na determinação do pior prognóstico, visa avaliar a doença sobre vários aspectos, principalmente em relação à invasão angiolinfática. A classificação segundo o *American Joint Comitee on Cancer* (AJCC), que está descrita no Anexo 2, baseia-se na avaliação da extensão tumoral (T), extensão do comprometimento linfonodal (N) e presença de metástases (M) (SOBIN e WITTEKIND 2004; EDGE et al. 2009).

Geralmente, o CP inicia-se como uma lesão na glândula que, quando não tratada estende-se para o prepúcio e evolui infiltrando tecidos adjacentes como o

tecido subepitelial conjuntivo, o corpo esponjoso e o corpo cavernoso até invadir órgãos adjacentes como próstata e bexiga levando à auto-amputação (POMPEO et al. 2006). Metástases linfonodais nas regiões femoral e ilíaca são vias de disseminação no carcinoma de pênis, consideradas principal fator prognóstico nessa neoplasia (NARAYANA et al. 1982; PERSKY e DEKERNION 1986; LOPES et al. 1994; LOPES et al. 1996a e b; CUBILLA 2009). Metástases por via hematogênica são raras, ficando entre 1% e 10% dos casos de CP (PURAS et al. 1978).

Apesar de todas as variáveis já estudadas e bastante exploradas no estudo do CP, existe uma preocupação por parte dos pesquisadores em estudar o tumor também em seus aspectos moleculares. Estudos realizados por LOPES et al. (2002) avaliaram a expressão da proteína p53, e o desfecho deste estudo foi a relação da proteína como fator independente de risco para metástase linfonodal e óbito. Outros autores também mostraram a associação entre a expressão da p53 e a presença de HPV como pior prognóstico para o câncer (MARTINS et al. 2002).

Marcadores de proliferação celular, o PCNA e o MIB-1/Ki67 foram avaliados em 125 casos de câncer de pênis por GUIMARÃES et al. (2007). Os resultados desse estudo revelaram uma associação com variáveis clínicas e anatomopatológicas. No entanto, o MIB-1/Ki67 apresentou-se como fator de risco independente para comprometimento metastático em linfonodos.

CAMPOS et al. (2006), avaliaram 125 casos de pacientes com carcinoma epidermóide de pênis por meio da técnica de imuno-histoquímica (IHQ), sendo pesquisada a expressão da proteína e-caderina (ECAD) e metaloproteinases (MMP) 2 e 9 como fatores prognósticos no câncer de pênis. Os autores relataram uma associação significativa da perda expressão da ECAD com metástases em linfonodos.

Em relação à recorrência da doença, a expressão da MMP-9 mostrou-se como fator independente de risco. SOARES et al. (2006), avaliando a expressão das proteínas MMP dos tipos 2 e 9 por IHQ, em três tipos de crescimento tumoral (exofítico, endofítico com grupo de grande células e endofítico com grupo de pequenas células isoladas) e invasão do carcinoma de pênis, observaram uma associação entre a expressão aumentada das MMPs 2 e 9 com um padrão de invasão maior, principalmente naqueles tumores com pouca diferenciação histológica.

ZHU et al. (2007) também constataram, em pacientes chineses, a correlação significativa entre a perda de expressão de ECAD e metástase linfonodal. Entretanto, no estudo de LEAL (2008), a perda da expressão da ECAD não teve significado, como fator preditivo de metástases linfonodais.

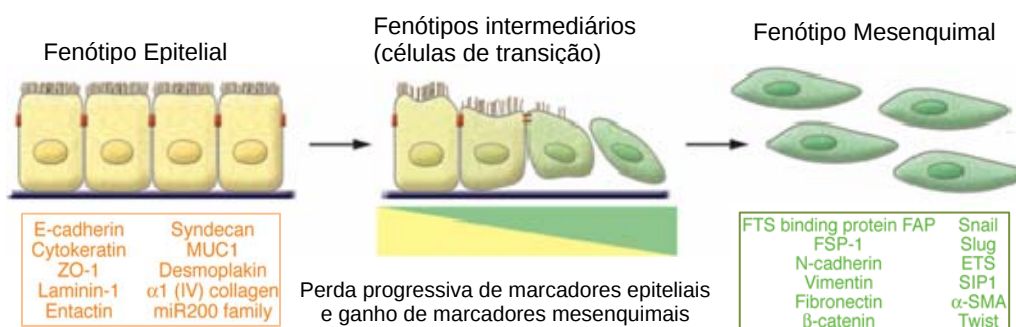
1.2 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

No tecido epitelial normal, as células formam camadas celulares que estão intimamente ligadas por estruturas especializadas de membrana. A adesão entre as células epiteliais é um fenômeno fundamental para a manutenção da homeostasia do tecido. Esta adesão ocorre por diferentes complexos celulares: junções aderentes (*tight junctions*), desmossomas, zônula oclusiva e junção comunicante (*gap junction*), cada uma delas com funções distintas. O epitélio apresenta polarização basolateral-apical, que é decorrente da distribuição organizada de caderinas e algumas integrinas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1997; SCHOCK e PERRIMON 2002). Abaixo das camadas de células epiteliais encontra-se a membrana basal que

separa células epiteliais de suas subcamadas de células mesenquimais (ALBERTS et al. 2004).

As células mesenquimais, células do tecido conjuntivo, possuem um aspecto fusiforme, e o fibroblasto é a célula prototípica. Este tipo celular, apesar de ter sido o primeiro a ser cultivado em cultura, é um dos menos compreendidos ao nível molecular (KALLURI 2009).

A transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*) é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal por meio de sua superfície basal, sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão, resistência a apoptose aumenta. Esta modificação está exemplificada na Figura 1 (KALLURI e WEINBERG 2009).



Fonte: Adaptado de KALLURI e WEINBERG (2009).

Figura 1 - EMT: Modificação de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal.

A EMT requer mudanças complexas na arquitetura tecidual e no comportamento celular (SCHOCK e PERRIMON 2002; ACKLAND et al. 2003; RADISKY 2005).

Durante a embriogênese, a EMT é um processo de grande importância. Nesse caso, o epitélio é bastante plástico e é capaz de se modificar de epitélio para mesênquima, e vice-versa (processo reverso à EMT, denominado *mesenchymal-epithelial transition*, ou MET) (THIERY 2002). Posteriormente, foi demonstrado que, mesmo após sua completa diferenciação, o epitélio retém a capacidade de modificar seu fenótipo sob a influência de estresse patológico ou associado ao reparo tecidual (BOYER et al. 2000).

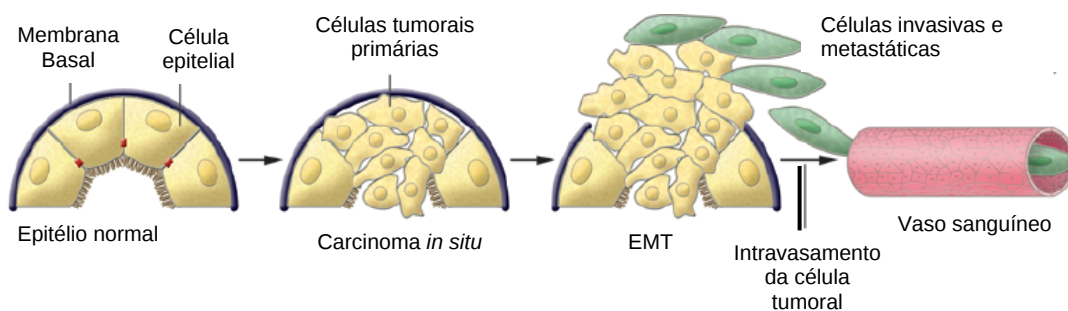
Três tipos distintos de EMT foram determinados. O tipo um, gera células mesenquimais para que haja modificação da função tecidual e é importante no cenário embrionário, o tipo dois, está associado ao reparo, cicatrização e regeneração tecidual. Nesse caso, há associação com inflamação, que é atenuada após a cicatrização. Por fim, o tipo três ocorre em células epiteliais cancerosas, que se diferenciam genética (mutação) e epigeneticamente por modificações do DNA e das histonas que são herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA. Na molécula de DNA ocorre apenas a metilação, entretanto as histonas podem sofrer a metilação, fosforilação e acetilação (TING et al. 2006; ZEISBERG e NEILSON 2009). Essas alterações ocorrem, principalmente, em protooncogenes e genes supressores de tumor. Células geradas pela EMT do tipo três podem invadir e metastatizar através da circulação, gerando assim, manifestações sistêmicas da progressão da neoplasia (KALLURI e WEINBERG 2009).

Os estudos com camundongos e linhagens celulares demonstraram que células do tumor adquirem um fenótipo mesenquimal e expressam marcadores específicos para este tipo celular, como α -SMA, FSP1, vimentina e desmina (YANG e WEINBERG 2008).

Durante a EMT, as células epiteliais passam a expressar proteínas mesenquimais, como a vimentina, e esta expressão anômala é a manifestação mais marcante do fenômeno de EMT. Além disso, a expressão de vimentina apenas no microambiente e não no tumor, é considerado um marcador importante de remodelamento do microambiente que parece ficar mais permissivo e passível de infiltração, leniente ao comportamento invasivo da célula tumoral (DUTSCH-WICHEREK 2010).

O primeiro evento neste processo é a perda da polaridade das células epiteliais, que então se desprendem da membrana basal. A composição da membrana basal também se altera, modificando as interações e as vias de sinalização entre célula e matriz. Neste momento, ocorre a perda de expressão de alguns marcadores epiteliais, como a ECAD, responsáveis pela estabilidade da ligação entre célula-célula, e entre célula e matriz. Outros marcadores mesenquimais como a vimentina, começam a ser expressos, dando à célula um fenótipo mais fusiforme e propício à invasão (KALLURI e WEINBERG 2009).

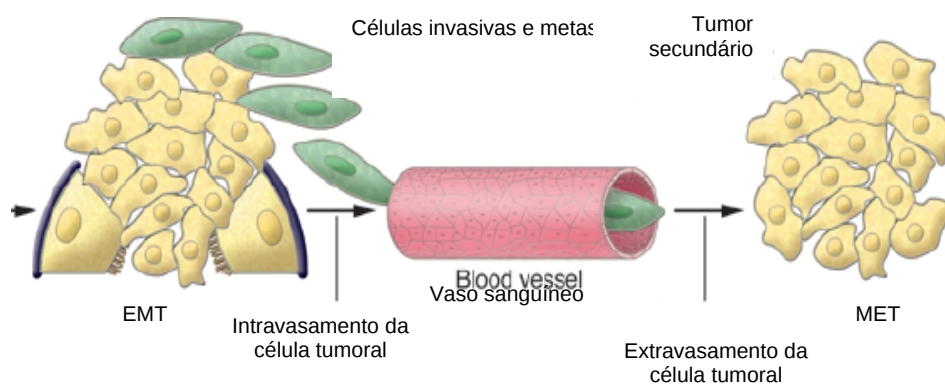
O próximo passo da transição é o *switch* angiogênico, que estimula a formação de novos vasos no microambiente tumoral e facilita o processo de malignização e formação de metástases (KALLURI e WEINBERG 2009). Os passos podem ser observados na Figura 2.



Fonte: Adaptado de KALLURI e WEINBERG (2009)

Figura 2 - EMT do tipo 3 contribuição da EMT para a progressão tumoral.

A progressão para o estágio metastático também envolve o processo de transição, que capacitará as células tumorais a entrar e sair da circulação em sítios remotos, onde formarão macro ou micrometástases. Enquanto a EMT auxilia no intravasamento, o extravasamento e o alojamento em sítios distantes são propiciados pela MET (KALLURI e WEINBERG 2009) (Figura 3).



Fonte: Adaptado de KALLURI e WEINBERG (2009)

Figura 3 - Processos EMT e MET na metastatização dos tumores.

Algumas classes de marcadores epiteliais e mesenquimais têm sido utilizadas para determinar a presença de EMT em tecido neoplásicos. Essas classes abrangem proteínas de superfície (como ECAD), marcadores do citoesqueleto (como vimentina, β -catenina) e fatores de transcrição (como SNAIL, SLUG e TWIST) (ZEISBERG e NEILSON 2009).

As mudanças bioquímicas associadas à EMT podem ser induzidas por muitos fatores de transcrição. As pesquisas recentes têm mostrado papel importante das proteínas SNAIL e SLUG na mediação da EMT, em eventos celulares de migração, invasão, e sobrevivência, que podem levar à progressão de neoplasias epiteliais e são hábeis para reprimir a transcrição da ECAD, aumentar a expressão e a atividade das MMPs e, como consequência, aumentar a capacidade de invasão das células tumorais (BATLLE et al. 2000; OKUBO et al. 2001). A expressão do fator de transcrição TWIST está envolvido na repressão de marcadores epiteliais, especificamente ECAD, β -catenina e γ -catenina, ao mesmo tempo em que está envolvido na indução da expressão de marcadores mesenquimais, especificamente vimentina e fibronectina sendo estes também um marcador explorado em estudos que avaliam a EMT (YANG et al. 2004).

1.2.1 E-caderina

A família das caderinas é um dos principais marcadores de células epiteliais. Essa família é constituída de moléculas de ancoragem do citoesqueleto que formam complexos entre as membranas celulares, chamadas junções aderentes, uma das mais importantes estruturas de adesão.

Cada caderina é uma glicoproteína transmembrana de 720 a 750 aminoácidos, e se apresenta na forma de dímero. Ela é constituída por uma região extracelular de N-terminal e por uma camada citoplasmática de C-terminal. O domínio extracelular contém sequências repetidas às quais se liga o cálcio, essencial para a função adesiva das caderinas que na sua ausência sofrem uma enorme alteração conformacional, sendo degradadas por enzimas proteolíticas (WHEELLOCK e JOHNSON 2003). O domínio citoplasmático associa-se ao citosqueleto da célula, o que não acontece com outras moléculas de adesão como as selectinas, integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas (IG). As caderinas foram nomeadas inicialmente de acordo com o tecido que as expressaram. A ECAD é encontrada em vários tipos de células epiteliais, a pan-caderina (PCAD) está presente em várias células placentárias e da epiderme e a n-caderina (NCAD) é expressa em células nervosas e nos músculos. Todas estas são classificadas como caderinas clássicas (LODISH et al. 2000; DERYCKE e BRACKE 2004).

A ECAD é uma molécula dependente de cálcio, de 120 kD, codificada pelo gene *CDH1* localizado no cromossomo 16q21 (DINIZ-FREITAS et al. 2006) e está envolvida no processo de adesão celular. Essas moléculas são compostas por três domínios: um citoplasmático que se liga à actina do citoesqueleto por meio de interações heterotípicas com proteínas chamadas cateninas, estabelecendo o complexo citoplasmático de adesão celular importante para a formação da adesão extracelular célula-célula; um transmembrânico; e um extracelular, que se liga por meio de ligações homofílicas dependentes de cálcio, ao domínio extracelular de ECAD de uma célula vizinha, assumindo uma conformação “Zipper-Like” (BEAVON 2000; HAJRA e FEARON 2002).

A expressão da ECAD é necessária para a manutenção da integridade epitelial, e estudos indicam que a perda ou a expressão reduzida dessa molécula de adesão podem permitir ou aumentar o risco da progressão tumoral, além de provocar o aumento da invasão, e o desenvolvimento de metástase (PEINADO et al. 2004; ALBERTS et al. 2004; DERYCKE e BRACKE 2004).

Estudar o papel funcional da ECAD pode fornecer informações sobre o mecanismo biológico da progressão tumoral e também possibilitar a identificação de novos alvos moleculares na terapia anti-câncer (CAVALLARO et al. 2002).

As alterações na morfogênese e arquitetura do tecido epitelial; a perda da polaridade celular e inibição por contato; o crescimento desregulado e a invasão de tecidos adjacentes; e as mudanças nas propriedades de adesão das células tumorais, estão associadas com a progressão tumoral e formação de metástases e, freqüentemente, coincidem com a perda da adesão celular mediada por ECAD, (HANDSCHUH et al. 1999; CAVALLARO e CHRISTOFORI 2001).

A diminuição da expressão das moléculas de ECAD é o primeiro passo do fenômeno de EMT e é encontrado nas primeiras etapas da invasão e metástase de células tumorais (BOYER et al. 2000).

SCHIPPER et al. (1991), avaliaram a relação entre a expressão da ECAD e o grau de diferenciação histológica em carcinoma de cabeça e pescoço, e demonstraram que a expressão de ECAD está relacionada diretamente com o grau de diferenciação. Tumores bem diferenciados expressam e-caderina igual aos tecidos normais, enquanto tumores moderadamente diferenciados expressam e-caderina de forma heterogênea e os tumores pouco diferenciados todos perdem a expressão de e-caderina. Os autores sugeriram que a perda da expressão dessa molécula é importante

na progressão desses carcinomas e a ausência de expressão estaria associada à perda de diferenciação e com o aparecimento de metástases. Em outro estudo, com 50 amostras de carcinoma de cabeça e pescoço, também foram observadas associações entre a expressão de ECAD e o grau de diferenciação (MATTIJSEN et al. 1993), entretanto não foi observada associação entre a expressão desta molécula e o estadiamento T e N. Nesse estudo foi avaliada a sobrevida dos pacientes levando os autores a concluir que os pacientes em que se verificaram os melhores índices de sobrevida foram aqueles que apresentaram forte expressão de ECAD.

Em tumores de mama, alterações do padrão de expressão de caderinas e cateninas parecem ser um bom indicador prognóstico (WHEELLOCK et al. 2001). Em uma metanálise com carcinoma ductal invasivo de mama, a perda de expressão de ECAD foi considerada como indicador independente de pior prognóstico, apesar da heterogeneidade de critérios adotados nos trabalhos incluídos no estudo (GOULD ROTHBERG e BRACKEN 2006). Em câncer de esôfago, a perda de expressão de ECAD está associada com crescimento infiltrativo, estadio tumoral mais avançado e maior risco de metástase linfonodal (STREIT et al. 1996; NATSUGOE et al. 2007). Em meningiomas, a expressão de ECAD diminui com a malignidade tumoral (ZHOU et al. 2010). Em carcinoma de pulmão não pequenas células, a perda deste marcador foi associada ao estadio avançado e envolvimento pleural visceral, além de ser fator independente para óbito (LIN et al. 2010). Em carcinoma escamoso oral, esta perda também esteve associada à recorrência e morte (LIU et al. 2009). A relação contrária também já foi demonstrada em alguns estudos. A superexpressão de ECAD mostrou associação com tumorigênese e formação de embolo tumoral em tumores de ovário e mama, respectivamente (SUNDFELDT 2003; NAORA e

MONTELL 2005; KLEER et al. 2001). Em gliomas, a expressão de ECAD também se correlacionou com prognóstico desfavorável (LEWIS-TUFFIN et al. 2010).

Como referido anteriormente, o nosso grupo demonstrou que a perda da expressão de ECAD se correlacionou com a presença de metástases linfonodais em 125 pacientes portadores de CP (CAMPOS et 2006). Estes dados foram corroborados por ZHU et al. (2007).

Entretanto, quando nosso grupo decidiu validar estes resultados utilizando arranjo tecidual em matriz (TMA), a importância da ECAD como fator prognóstico não se repetiu (LEAL 2008).

1.2.2 Vimentina

Os filamentos intermediários (FIs) são os filamentos mais abundantes do citoesqueleto, possuem um diâmetro de 7 e 11 nm, formando uma rede estrutural que conecta as membranas celulares, organelas citoplasmáticas e o núcleo, e conferem resistência mecânica as células, juntamente com o microfilamento de actina (5-6 nm) e microtúbulos (20-25 nm). São formados a partir da duplicação dos genes das lâminas nucleares. Entre os FLs encontram-se a proteína Vimentina de origem do tecido mesenquimal (ALBERTS et al. 2004).

A vimentina é uma proteína de 55 kDa que está ligada ao núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria. Desempenha um papel importante dando suporte e ancorando as organelas no citosol (DUTSCH-WICHEREK 2010). Apesar desta função já ser bastante conhecida, existem evidências de que este filamento exerça um papel regulatório em outras funções celulares envolvendo a adesão, migração e sinalização celular e desempenhando um papel essencial na EMT (IVASKA et al.

2007). Os filamentos de vimentina se associam formando estruturas rígidas e altamente resistentes a forças de tração. Podem estar presentes no citoplasma das células tumorais ou apenas no microambiente. A maior parte das células de origem mesenquimal - como os fibroblastos, células endoteliais ou não mesenquimal, possuem filamentos de vimentina, que podem ser diferenciados imuno e bioquimicamente das outras classes de filamentos intermediários (ALBERTS et al. 2004).

A regulação negativa da expressão da vimentina diminui o potencial migratório das células tumorais, como demonstra estudo realizado com cultura de células de carcinoma de mama e cólon, sugerindo que esta proteína seja realmente fundamental para a manutenção do fenótipo invasivo (MCINROY e MÄÄTTÄ 2007).

A vimentina não foi alvo de investigações no CP, no carcinoma epidermóide da cavidade oral (CEC ORAL) o aumento da expressão de vimentina esteve associado a óbito e recorrência (LIU et al. 2010). Em um estudo com melanoma primário, foram encontrados altos níveis de vimentina em pacientes com metástases hematogênicas, indicando pior prognóstico (LI et al. 2010). Em carcinomas de esôfago, a expressão de vimentina foi fator independente de risco para metástases em linfonodos, com risco três vezes superior para pacientes positivos para o marcador, além de estar frequentemente expresso em “carcinoma metastático do linonodo” (JIN et al. 2010).

Em tumores de cabeça e pescoço, a forte expressão de vimentina, já foi observada e parece aumentar à medida que o tumor cresce. Foi observada que a localização citoplasmática da proteína vimentina em linhagens celulares desse

carcinoma pode variar de acordo com estágio de proliferação, características intrínsecas celulares, localização do tumor, e se o tumor é metastático ou não (DUTSCH-WICHEREK 2010). Uma consideração relevante é o fato de que essa característica mesenquimal que as células tumorais epiteliais passam a apresentar pode estar relacionada com resistência a terapias. Terapias alvo de EGFR, por exemplo, não são eficazes em células com fenótipo mesenquimais, uma vez que os marcadores epiteliais são perdidos. A quimioterapia convencional também parece ter eficiência diminuída nessa subpopulação celular (BASU et al. 2010). Ainda, em alguns trabalhos, o aumento da expressão de vimentina pareceu estar fortemente associado à diminuição de expressão de ECAD (HUBER et al. 2005; CHRISTIANSEN e RAJASEKARAN 2006; MANDAL et al. 2008; LIU et al. 2010).

1.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi exposto, está claro que o fenômeno de EMT é muito importante no comportamento biológico das neoplasias malignas. É um fenômeno que ocorre em todos os tumores epiteliais e faz parte do modo como as células neoplásicas se comportam para invadirem o estroma adjacente. Qualquer que seja a via de ativação do processo, o fenômeno seminal é a inibição da função da ECAD. Esta regulação negativa pode ocorrer por diversos mecanismos como: a expressão de fatores de transcrição, principalmente da família SNAIL e TWIST; metilação, mutação ou regulação dos fatores de crescimento como os EGFs, PDGFs. Quando isto ocorre, outras moléculas do complexo de adesão também diminuem, e de

moléculas que modificam o citoesqueleto das células epiteliais, como a vimentina. Essa alteração transitória sofre reversão quando o tumor se torna invasivo dos vasos.

Embora este seja um fenômeno muito bem descrito em outras neoplasias, no CP a literatura é ainda bastante precária. Como dito anteriormente, nosso grupo demonstrou que a perda da expressão de ECAD pode ter valor prognóstico (CAMPOS et al. 2006), dado que foi corroborado por ZHU et al. (2007). Entretanto, LEAL (2008), em sua dissertação de mestrado, não foi capaz de validar a ECAD como fator prognóstico no carcinoma de pênis. Esse foi um resultado absolutamente inesperado, uma vez que a parte da casuística utilizada por LEAL (2008) era a mesma que a utilizada por CAMPOS et al. (2006), somente com um número maior de casos. Uma vez que as duas dissertações foram realizadas em nosso laboratório, somente artefatos metodológicos poderiam explicar as diferenças dos achados. As duas principais diferenças na metodologia foram o uso de anticorpos diferentes e da técnica de amostragem dos casos. No manuscrito de CAMPOS et al. (2006) utilizamos um anticorpo pan-caderina e a coloração foi realizada em cortes inteiros usuais, enquanto que na dissertação de LEAL (2008) foi utilizado um anticorpo mais específico e a amostragem por arranjos de tecidos em matriz (TMA).

Por outro lado, em nenhum trabalho na literatura foi descrito o uso de vimentina como marcador prognóstico do câncer de pênis.

Por este motivo, este estudo foi desenhado para avaliar a expressão de ECAD e vimentina, como marcadores do fenômeno de EMT, para validar o real valor prognóstico no carcinoma de pênis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o fenômeno EMT, através da expressão imuno-histoquímica da ECAD e da expressão de vimentina, e sua correlação com os fatores clínico-patológicos prognósticos conhecidos e a evolução clínica de casos de pacientes portadores de carcinoma de pênis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar objetivamente a expressão da ECAD em células da mucosa não-neoplásica (MNN), da porção superficial e central do tumor (TPSC) e do fronte de invasão tumoral (TFI) através da técnica de IHQ;

Analisar o ganho de expressão de vimentina nas células tumorais;

Correlacionar os achados de perda da expressão de ECAD na TPSC e no TFI e do ganho de expressão de vimentina com os parâmetros clínicos patológicos já estabelecidos no carcinoma de pênis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

As amostras foram selecionadas de casos que compõem a blocoteca do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período entre 1965 a 2008, constando de 151 casos de pacientes portadores de CP e 14 amostras de postectomias de pacientes sem história pregressa de nenhuma neoplasia. Somaram a estes casos, as áreas de mucosa-não-neoplásica a distância do tumor 77, perfazendo o total de 91 casos de mucosa não-neoplásica analisados.

Os dados clínicos dos pacientes com CP, foram obtidos a partir do banco de dados específico para a doença do Departamento de Cirurgia Pélvica, divisão de Urologia, cujos principais dados foram utilizados em diversas teses/dissertações (GUIMARÃES 2003, SOUZA-NETO 2008; LEAL 2008; ANDRADE 2009; MOURA 2009; GUIDONI 2010; SILVA 2010; GUIMARÃES 2010) e extensamente publicadas (VILLA e LOPES 1986; LOPES et al. 1996a e b; LEVI et al. 1998; BEZERRA et al. 2001a e b; LOPES et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2006a e b; SOARES et al. 2006; CAMPOS et al. 2006; CUBILLA et al. 2007; GUIMARÃES et al. 2007; VELAZQUEZ et al. 2007, 2008; GUIMARÃES et al. 2009; CUNHA et al. 2009; CHAUX et al. 2009a ou b; GUIMARÃES et al. 2011).

3.1.1 Critérios de Inclusão

As amostras foram selecionadas a partir dos seguintes critérios:

- 1 Bloco histológico, cuja representação incluisse toda a extensão vertical do tumor, ou seja, da superfície (ulcerada ou íntegra) até o ponto de invasão mais profunda;
- 2 Blocos que tivessem material residual suficiente para a execução do novo corte a ser corado na hematoxilina/eosina e colorações IHQ;
- 3 Casos de pacientes com pelo menos três anos de seguimento após o tratamento ou cujo evento terminal tenha ocorrido neste período;
- 4 Material em boas condições pré-análíticas pelo controle interno da expressão imuno-histoquímica da cetoceratina pelas células tumorais e vimentina na lâmina própria;
- 5 Prepúcio de pacientes sem história de câncer e cujos espécimes foram totalmente examinados e sem evidência de alterações histológicas no extrato epitelial e/ou inflamação em atividade.

3.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos de pacientes que tivessem metástase à distância ao diagnóstico (estadio clínico IV).

3.1.3 Exame Anatomo-patológico

Por se tratar de estudo retrospectivo, os protocolos de fixação e inclusão foram variáveis de acordo com a época. Os dados macroscópicos foram recuperados de laudos anatomo-patológicos e constam no banco de dados de CP, e não utilizados

neste estudo. Todos os blocos foram recortados e as lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina (HE) e revisadas por três patologistas, (Professor Dr. Fernando Augusto Soares e Professora Dra. Isabela Werneck da Cunha do Departamento de Patologia do Hospital do A C Camargo e pelo Dr. Antonio Cubilla do Instituto de Investigación Científica, Assunção, Paraguay).

A comparação da perda de expressão de ECAD e ganho de vimentina foi adotada de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1 Grau de diferenciação do tumor de acordo com os critérios publicados por VELAZQUEZ et al. (2008) com as categorias: bem, moderadamente e pouco diferenciado;
- 2 Padrão de infiltração de acordo com os critérios publicados por GUIMARÃES et al. (2009) em padrões de frente de invasão bem delimitada e mal delimitado.
- 3 Estadio T de acordo com o sistema TNM (AJCC (2010) e divididos de T1 a T4;
- 4 Metástase linfonodal presente ou ausente, definido nos estudos de HORENBLAS et al. (1993) e CUBILLA et al. (1993) com invasão do tumor no tecido linfonodal maior que 2 mm.
- 5 Invasão perineural (IPN) definida de acordo com a publicação de CUBILLA et al. (2007), VELAZQUEZ et al. (2008) e dividida em presente/ausente.
- 6 Invasão vascular linfática ou venosa (IV) definida de acordo com a publicação de LOPES et al. (1996a), e dividido em presente/ausente.

3.1.4 Caracterização da amostra

As amostras de 151 casos de pacientes com CP foram compostas por homens com média da idade de 55,45 +/- 14,89 anos, mediana de 55 anos, (Figura 4).

Os dados clínicos patológicos estão sumarizados na Tabela 1.

A amostra foi constituída, principalmente por tumores amplamente invasivos sendo que 68,8% invadiram corpos esponjosos e/ou cavernosos e 18,5% a uretra. Apenas 12% eram tumores superficiais. Cerca de 27% dos casos apresentavam metástases linfonodais.

A amostra foi constituída por proporções relativamente similares entre tumores bem diferenciados (26,4%) moderadamente diferenciados (34%) e pouco diferenciados (39%). A invasão vascular foi detectada em 25,8% dos casos e a IPN em 23% dos casos. A maioria dos casos tinha frente com padrão de invasão mal delimitado-infiltrativo (78%).

Quanto ao tipo histológico, a maioria dos casos correspondia a carcinoma epidermóide usual (76,%). Os demais representaram cinco casos de carcinoma basalóide (3,3%), nove casos de carcinoma condilomatoso (5,9%), seis casos de carcinoma epidermóide papilífero (3,9%), dois casos de carcinoma *cuniculatum* (1,3%), três casos de carcinoma acantolítico (1,9%), e onze casos de carcinoma verrucoso (7,2%). Os tumores de padrão misto foram considerados a partir do tipo histológico predominante.

As amostras de mucosa normal foram obtidas a partir de postectomias (14 casos) de pacientes sem história pregressa de neoplasia. Foram somadas a esses casos, as áreas de mucosa-não-neoplásica a distância do tumor (77 casos),

perfazendo o total de 91 casos analisados. Não foi considerada a MNN que revertia áreas neoplásicas.

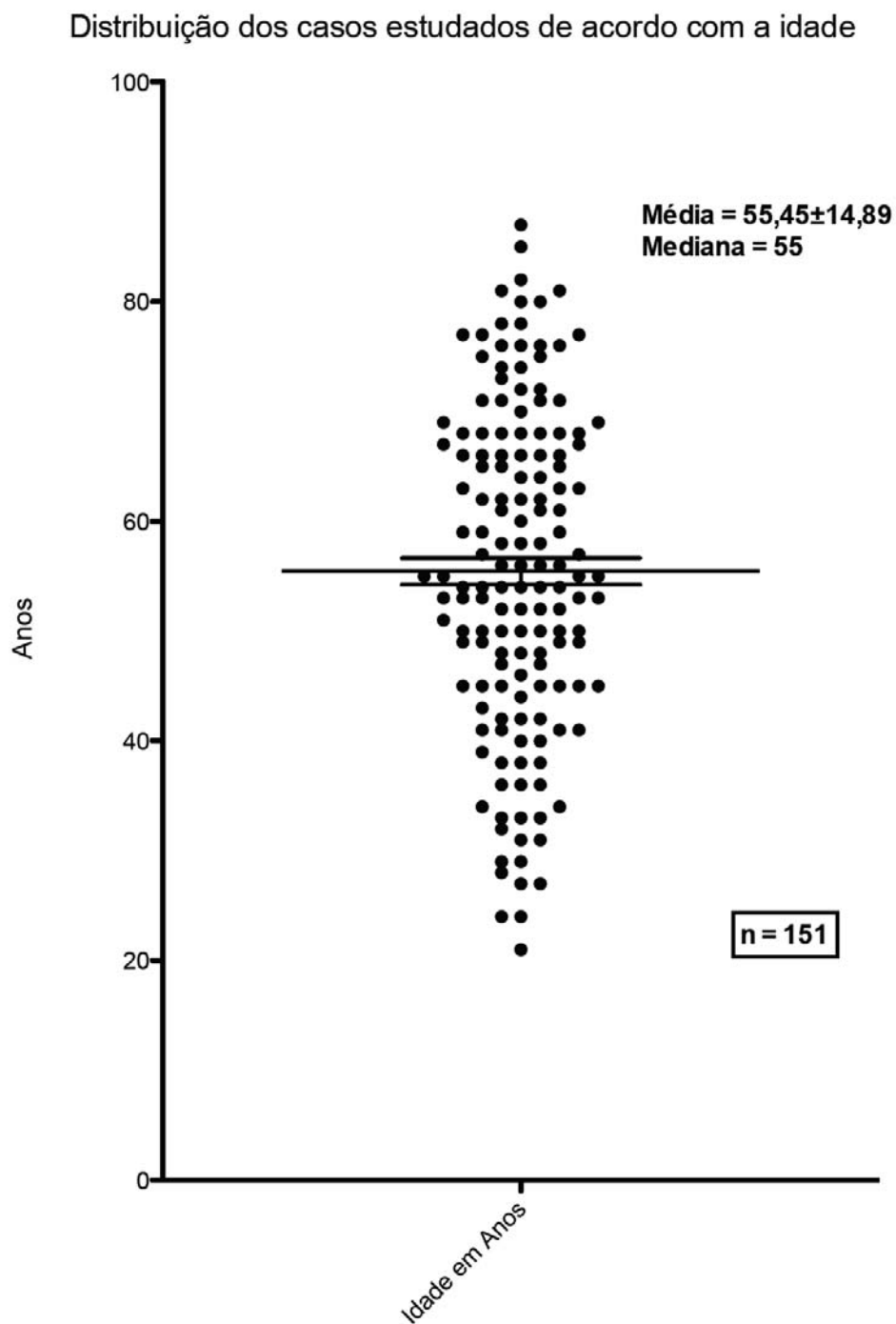


Figura 4 - Distribuição dos pacientes com carcinoma de pênis de acordo com a idade.

Tabela 1 - Amostra de acordo com os parâmetros clínico-patológicos estudados.

Características	N=151	%
Tipo Histológico		
Carcinoma epidermóide usual	115	76,1
Verrucoso	11	7,2
Condilomatoso	09	5,9
Papilífero	06	3,9
Basalóide	05	3,3
Acantolítico	03	1,9
Cunilatun	02	1,3
Estadio T		
T1	18	11,9
T2	93	61,5
T3	40	26,4
Metástase Linfonodal		
Sem metástase	110	72,8
Com metástase	41	27,1
Grau Histológico		
Bem diferenciado	40	26,4
Moderadamente diferenciado	52	34,4
Pouco diferenciado	59	39
Invasão Vascular		
Sem invasão	112	74,1
Com invasão	39	25,8
Invasão Perineural		
Sem invasão	116	76,8
Com invasão	35	23,1
Padrão Infiltrativo		
Bem delimitado	33	21,8
Mal delimitado	118	78,1

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Para as reações imuno-histoquímicas, foram utilizados os anticorpos monoclonais NCH-38 (DAKO), para avaliação da ECAD, e V9 (DAKO), para estudo de vimentina. Os dois anticorpos foram obtidos pela empresa DAKO (Carpinteria, USA). Outras informações estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2 - Informações sobre os anticorpos e os dados das reações utilizados no presente estudo.

Anticorpo	Fabricante	Código	Clone	Recuperação antigênica	Diluição
ECAD	DAKO	M3612	Monoclonal de camundongo NCH-38	Citrato pH6.0 Banho-maria	1:100
Vimentina	DAKO	M0725	Monoclonal de camundongo V9	Citrato pH6.0 Panela pressão	1:200

Após a seleção dos casos no arquivo do Departamento de Anatomia novos cortes histológicos de 4 µm foram obtidos dos blocos de parafina selecionados e colocados em lâminas com carga elétrica positiva.

Os cortes foram desparafinizados em 3 banhos de xilol por 5 minutos, seguido de re-hidratação em soluções decrescentes de etanol e a recuperação antigênica conforme indicado na Tabela 2.

Após a recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em peróxido de hidrogênio 3% (10V), 3 vezes por 5 minutos cada, para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água corrente por 5 minutos. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com caseína (*Protein Block*

Serum-Free- DakoCytomation, Carpinteria, USA), por 20 minutos, à temperatura ambiente em câmara úmida.

Os anticorpos primários foram diluídos em solução comercial contendo 0,05 mol/L de tampão Tris-HCl e 0,1% de Tween 20 (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*, DakoCytomation, Carpinteria, USA) e as lâminas foram então incubadas a 4 °C, durante a noite (12 a 14 horas) em câmara úmida. A diluição de trabalho dos anticorpos está representada na Tabela 2. Após 3 lavagens com tampão PBS por 5 minutos cada, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, contendo *pool* de anticorpos anti-camundongo e anti-coelho, utilizando-se o *Kit AdvanceTM HRP* DAKO (Carpinteria, USA), por 1 hora em câmara escura, e lavadas com PBS três vezes, por 5 minutos cada.

As lâminas foram coradas com 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride DAKO (Carpinteria, USA) por 5 minutos, e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, desidratadas com álcool e xilol e montadas com meio permanente no equipamento Tissue-Tek®FILM (Sakura®).

Em todas as reações foram realizadas controle positivo, em tecido sabidamente reativo para cada anticorpo, além do controle realizado na própria lâmina-teste. Os controles negativos foram realizados por retirada do anticorpo primário e por substituição do mesmo por soro não imune.

3.3 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação da reação IHQ, foi realizada utilizando-se o aparelho Scanscope XT Scanner System - Aperio Technologies, Inc., Vista CA, EUA. De maneira resumida o Scanscope utiliza detectores de arranjo linear em conjunto com os componentes de controle de movimento em uma lente objetiva de microscópio óptico. Uma câmera com dispositivo de carga acoplada tradicional realiza a captura de várias regiões de uma lâmina em uma linha de varredura. Os fragmentos de imagem são alinhados para criar uma imagem digital de alta definição da lâmina histológica. Esse equipamento vem acompanhado de um programa de digitalização da imagem onde a região representativa do tumor é demarcada, quantificada e são atribuídos valores à intensidade da marcação. Esses dados são organizados em uma planilha.

Para a avaliação da perda de expressão de ECAD foram consideradas positivas, as células que apresentavam marcação de membrana. A contagem foi realizada de forma automatizada, utilizando o algoritmo original “*membrane I.*” Esse algoritmo classifica a reação em 4 graus, sendo consideradas positivas as marcações 3+, 2+ e 1+, e como negativas aquelas indicadas como 0 (zero).

Os casos foram divididos em três categorias, a saber:

Expressão normal-símile (“NL- Like”): todos os casos que apresentaram mais do que 62% das células expressando 2/3+ e menos do que 1,6% de células negativas;

Perda discreta de expressão (“mild Loss”): entre 50-62% das células positivas com intensidade de 2/3+ e entre 1,6-10% de células negativas;

Perda intensa da expressão (“*downregulated*”): menos do que 50% das células com intensidade de expressão 2/3+ e mais do que 10% de células negativas.

Estes parâmetros foram baseados em resultados obtidos na análise da expressão de ECAD na mucosa não-neoplásica.

Para as análises estatísticas de sobrevida estes grupos foram agrupados e comparados aos grupos de normal-símile e de perda discreta da expressão com os casos com perda intensa de expressão.

Para avaliação da expressão de vimentina foi considerada a marcação citoplasmática da célula neoplásica, localizada na borda infiltrativa dos tumores. Os casos com mais do que 10% das células expressando vimentina foram considerados positivos.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas de tendência central (média, mediana e percentil) e de variabilidade (desvio padrão e variação) foram adotadas, para descrever as variáveis numéricas e a distribuição de frequências (número de casos e percentual) para as categóricas.

Para as variáveis categóricas em tabela de contingência, foi utilizado o teste Qui-quadrado e o exato de Fischer foi adotado quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5 em tabela de contingência.

O tempo de seguimento foi calculado da data do início do tratamento até o óbito, ou até a última informação, e até a data de ocorrência de recidiva para o período livre de doença.

A técnica de Kaplan-Meier foi aplicada para estimar a probabilidade de sobrevida global (SG) e de sobrevida câncer específica (SCE) e o teste de Log-Rank, para comparar as curvas de sobrevida.

O nível de significância de 5% foi estabelecido em todos os testes estatísticos. Para o cálculo de todas as análises estatísticas foi utilizado o programa de computador estatístico GraphPad Prism 5 e o SPSS 18.

Os fatores prognósticos independentes foram estimados pela análise multivariada através do modelo de regressão de Cox, com a obtenção das estimativas dos riscos relativos (RR) de óbito e respectivos intervalos de confiança de 95%.

O modelo de Regressão Logística foi adotado para estimar os fatores de riscos independentes para ocorrência de metástase linfonodal.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DE ECAD

4.1.1 EXPRESSÃO DE ECAD NAS MUCOSAS NÃO-NEOPLÁSICAS

Para o estabelecimento do padrão de células expressando ECAD na mucosa não-neoplásica (MNN), foram testados 91 casos, dos quais 14 eram provenientes de postectomias de pacientes sem história de doença neoplásica (MNN-PT) e 77 eram casos de mucosa à distância do tumor e sem alterações morfológicas (MNN-TU). Para cada amostra foi medida a máxima área representado no corte histológico, sendo que o número de células medidas variou entre 1.575 a 26.555, com uma média de 6.128 ± 3.864 células por caso e mediana de 5.035 células por caso.

A primeira análise realizada foi feita para saber se a expressão de ECAD nas células da MNN era diferente ou não quando comparados os espécimes de MNN-PT e MNN-TU. Esta análise demonstrou que a média de células negativas nos casos MNN-PT foi de $0,35\% \pm 0,22$ com mediana de 0,27%, enquanto que nos casos da MNN-TU a média foi $0,4 \pm 0,64\%$ com mediana de 0,15%. Esta diferença não foi significativa no teste de Kruskal-Wallis. Em relação às células positivas (3/2+), na MNN-PT a média das células positivas foi de $73,41 \pm 6,74$, com mediana de 73,65, enquanto que na MNN-TU a média foi de $75,42\% \pm 6,13$ e mediana de 73,35% das células com expressão 3/2+. Estas diferenças não são significativas. Baseados nestes resultados, agrupamos os casos de mucosa não neoplásica de ambos os materiais em uma única amostra de MNN.

A maioria das células da MNN expressou ECAD (3/2+), sendo a variação de 60,23% a 85,95% das células da MNN, com média de $75,34\% \pm 5,92\%$ e mediana de 75,97%. Por outro lado, em relação às células que não expressavam ECAD observamos que apenas uma porção muito pequena podia ser identificada. A variação foi de 0% a 3,88%, com mediana de 0,2% e média de $0,40\% \pm 0,6\%$.

A Tabela 3 sumariza os resultados agrupados.

Estes resultados do padrão de expressão de ECAD nas células da MNN foram utilizados no estabelecimento dos parâmetros de análise para se considerar um tumor como normal-símile, com perda discreta ou com perda intensa de ECAD, conforme os limites descritos na sessão de material e métodos. Um exemplo da expressão forte de ECAD na MNN pode ser vista na Figura 5 onde praticamente toda a mucosa é positiva para o marcador.

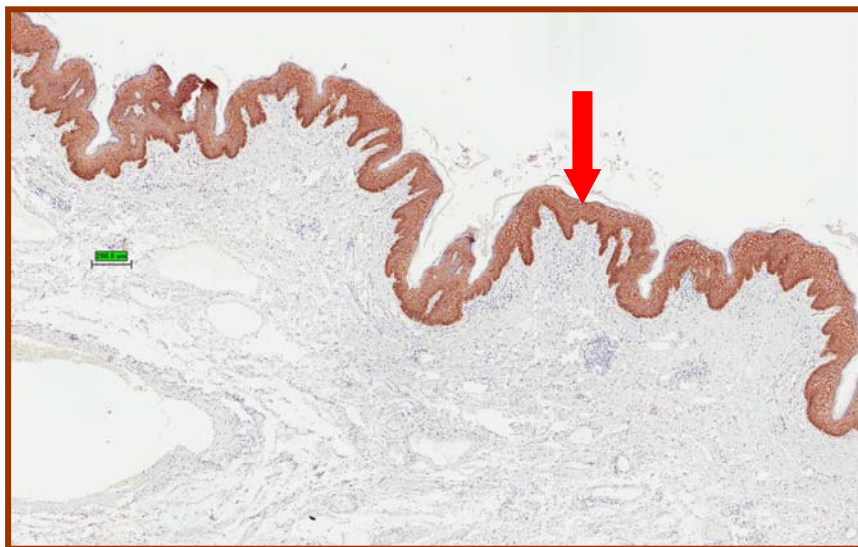


Figura 5 - Representação da reação de imuno-histoquímica, mostrando expressão positiva da ECAD na MNN de forma homogênea e forte.

4.1.2 Expressão de ECAD na Porção Superficial e Central do Tumor

Em relação à perda de expressão de ECAD na TPSC, foram analisados 151 casos com uma variação de 3.732 a 76.383 células, com uma média de 17.434 ± 8.534 células do tumor e mediana de 14.888 células. Foi observado que a média de células da TPSC que expressam fortemente ECAD foi de $51,55 \pm 22,82\%$, com mediana de 51,88 e variação entre 0,17 - 79,05% das células. Por outro lado, a perda total de expressão de ECAD (células negativas) variou entre 0,01 - 90,56%, com média de $8,90 \pm 15,82\%$ e mediana de 1,59% (Figuras 6 e 7).

Nas Figuras 6 e 7, podem ser vistos dois casos representativos desta variação de expressão observada. Na Figura 6 há um tumor, onde há expressão forte de grande maioria das células neoplásicas, enquanto que na Figura 7 há um tumor com expressão global diminuída. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

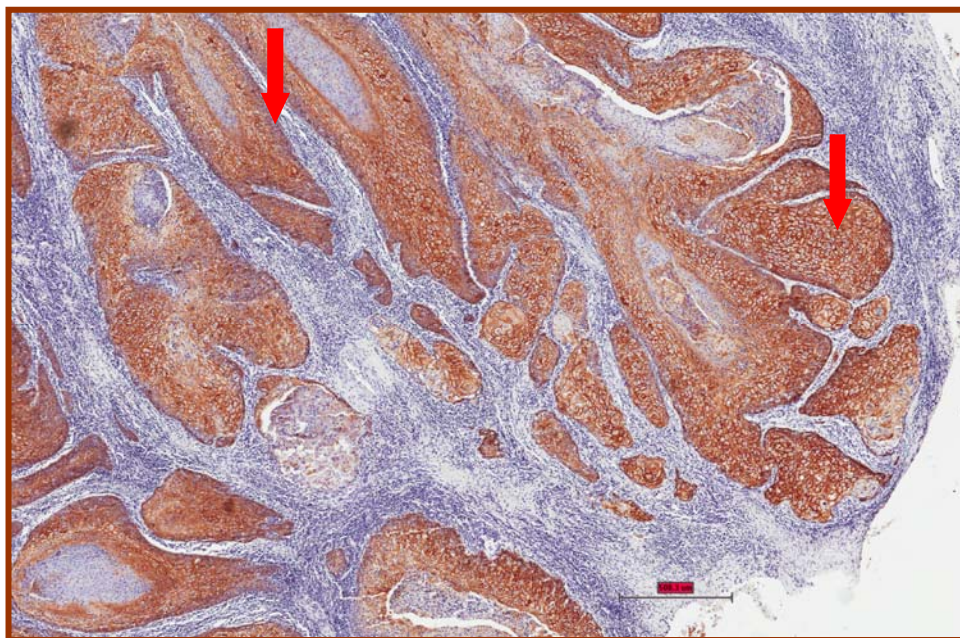


Figura 6 - Representação da reação de imuno-histoquímica com expressão forte de ECAD no tumor de forma difusa.

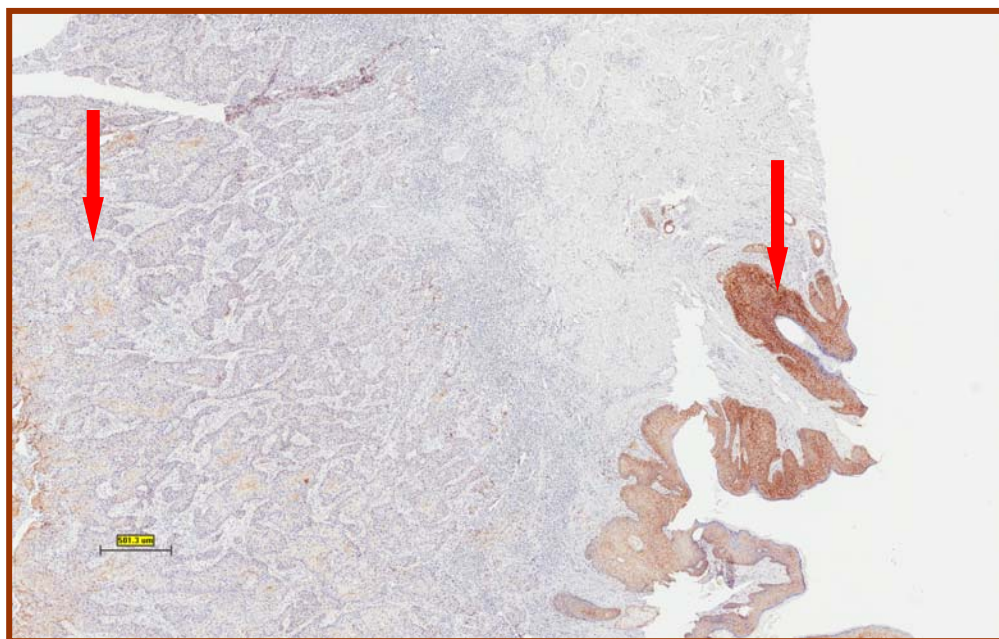


Figura 7 - Representação da reação de imuno-histoquímica com expressão fraca de ECAD no tumor, quando comparada com a mucosa não-neoplásica de revestimento.

4.1.3 Expressão de ECAD no Fronte de Invasão do Tumor

Em relação à perda de expressão de ECAD na TFI, foram analisados 151 casos, com uma variação de células contadas entre 1.058 e 18.793, com uma média 5.822 ± 3.527 de células do tumor e mediana de 5.019 células. Foi observado que a média de células da TFI que expressam fortemente ECAD foi de $30,04 \pm 25,73\%$, com mediana de 22,67. A variação foi de 0,07 - 75,80% das células. Por outro lado, a perda total de expressão de ECAD (células negativas) variou entre 0,04 - 90,56%, com média de $26,26 \pm 4,71\%$ e mediana de 17,03%.

Exemplos de perda de expressão de ECAD no TFI podem ser vistos nas Figuras 8 a 10. Na Figura 8, pode-se notar que a maioria do tumor expressa fortemente a ECAD, mas à medida que os pequenos blocos são mais invasivos, há a perda quase completa da expressão. Na Figura 9, em maior aproximação, este detalhe

pode ser mais bem apreciado. Na Figura 10, o notável é que os pequenos blocos de 2/3 células do TFI são completamente negativos, enquanto que as células que se agregam em grupos maiores e se diferenciam, mantêm a expressão de ECAD.

Todos os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

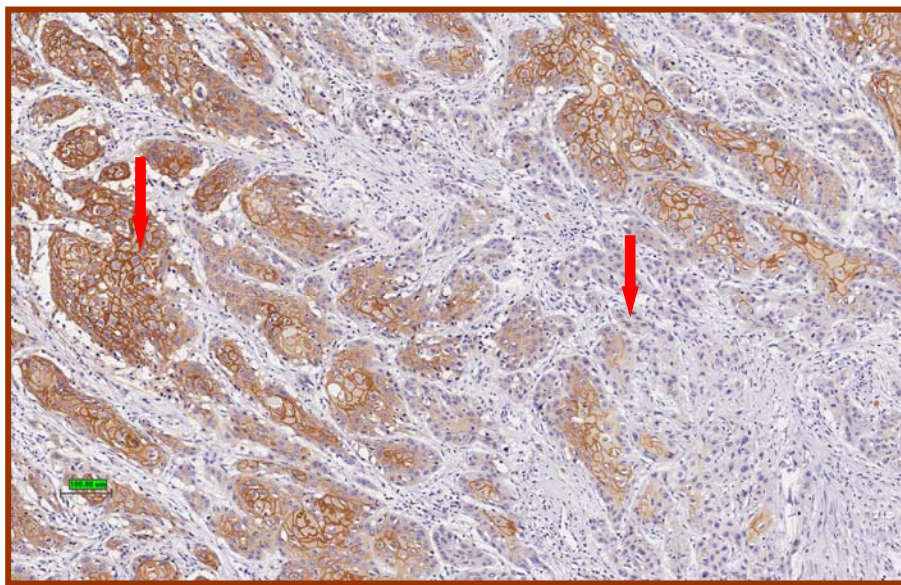


Figura 8 - Representação da reação de imuno-histoquímica com expressão de ECAD no tumor e no FTFI os pequenos blocos decorrentes da perda da expressão.

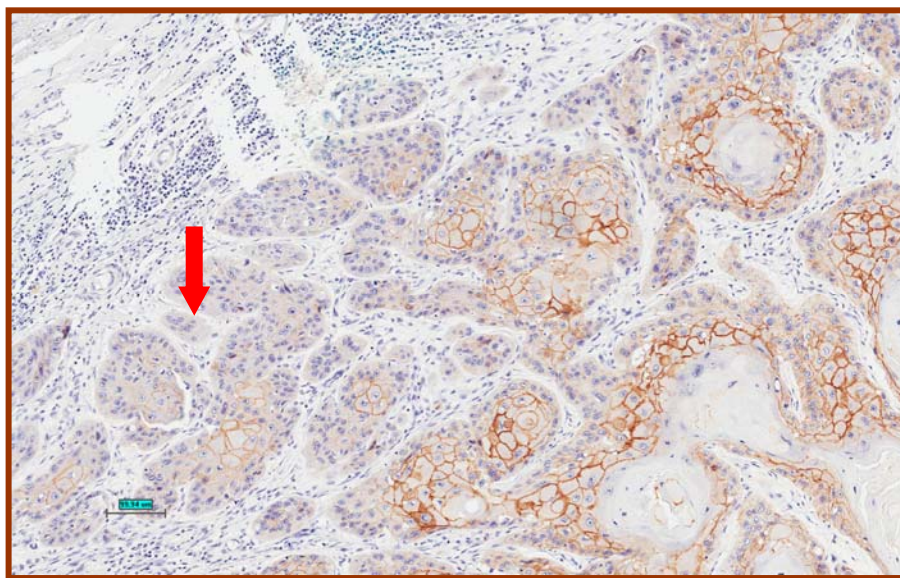


Figura 9 - Representação da reação de imuno-histoquímica em detalhe mostrando a perda de expressão de ECAD nos pequenos blocos.

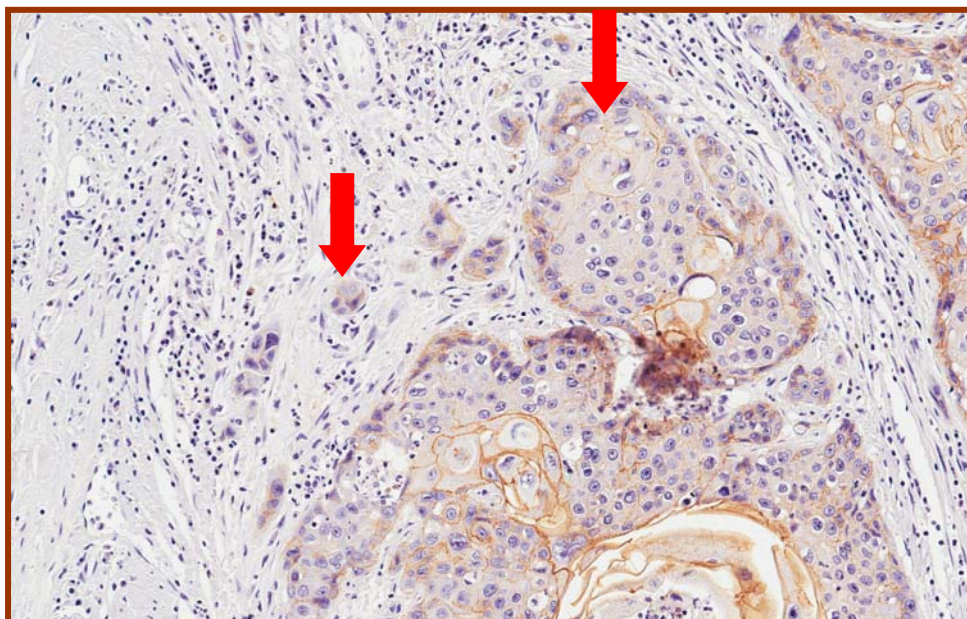


Figura 10 - Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando a perda de expressão de ECAD nos pequenos blocos infiltrativos e a expressão de ECAD forte no bloco terminal maior.

4.1.4 Comparação entre os Grupos MNN, TPSC e TFI

A análise comparativa entre a expressão de ECAD 3/2+ e da perda total da expressão (células negativas), entre os três grupos se mostrou diferente. Os tumores perdem a expressão de ECAD significativamente quando comparados com a MNN e no TFI. Esta alteração é observada em duas situações, ou seja, na manutenção da expressão (células 3/2+) ou na perda total da expressão (células negativas). A demonstração gráfica destes resultados pode ser apreciada nas Figuras 11 e 12 e Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre a variação da expressão de ECAD na MNN na TPSC e no TFI.

	MNN (n=91)	TPSC (n=151)	TFI (n=151)
Média ± DP das células 3/2+	75,34% ± 5,92%	51,55% ± 22,82%	30,04% ± 25,73%
Variação de células 3/2+	60,23% - 85,95%	0,17% - 79,05%	0,07% - 75,80%
Mediana de células 3/2+	75,97%	51,88%	22,67%
Média ± DP das células neg	0,40% ± 0,6%	8,90%	26,26% ± 24,71%
Variação de células neg	0% - 3,88%	0,01% - 90,56%	0,04% - 90,56%
Mediana de células neg	0,2%	1,59%	17,03%

Legenda: TPSC= Porção superficial e central do tumor

TFI= Fronte de invasão tumoral

DP= Desvio padrão

NEG= Células sem expressão de ECAD

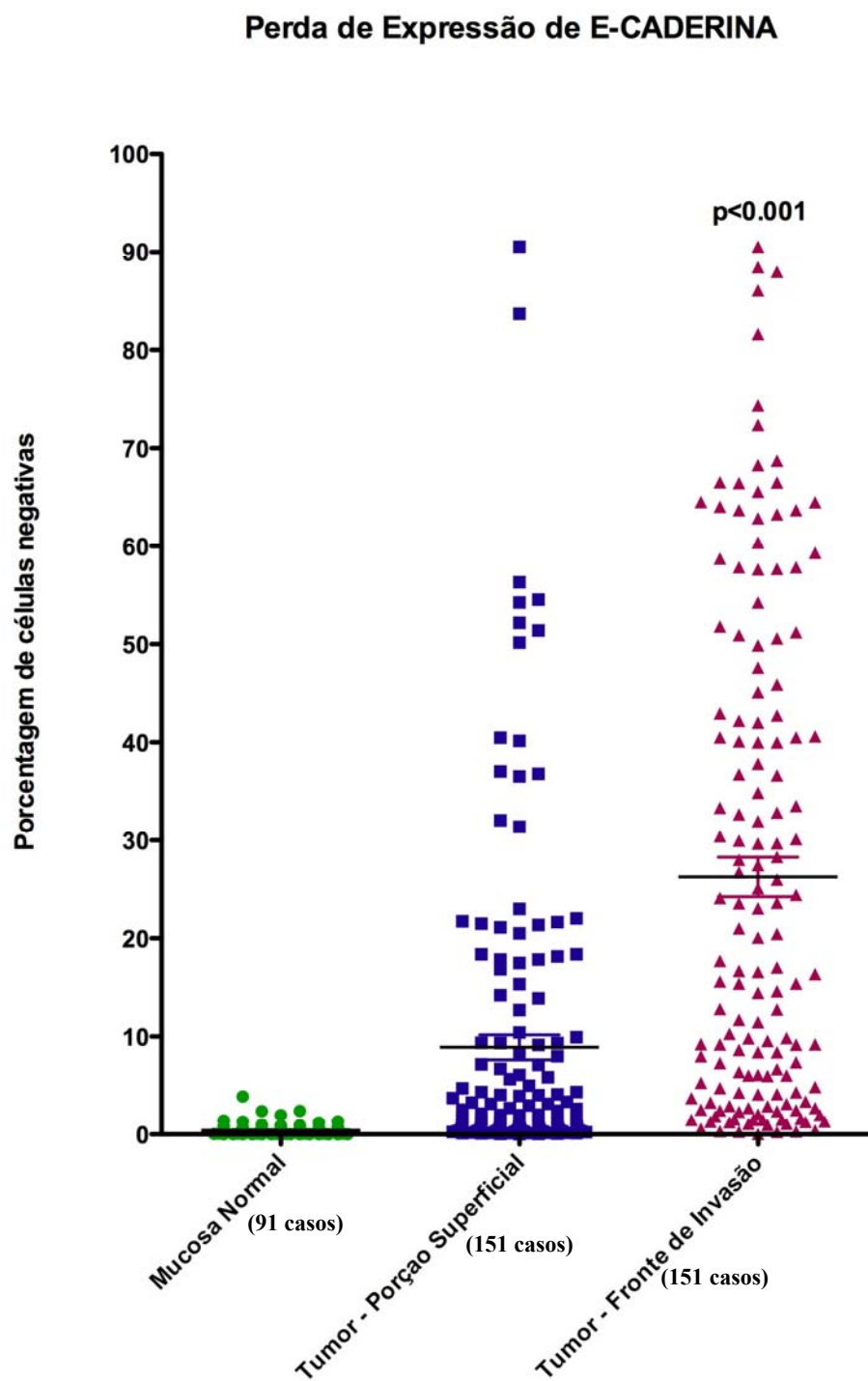


Figura 11 - Comparação dos valores descritivos de perda de ECAD (células negativas) na MNN e TFI em amostras de CP.

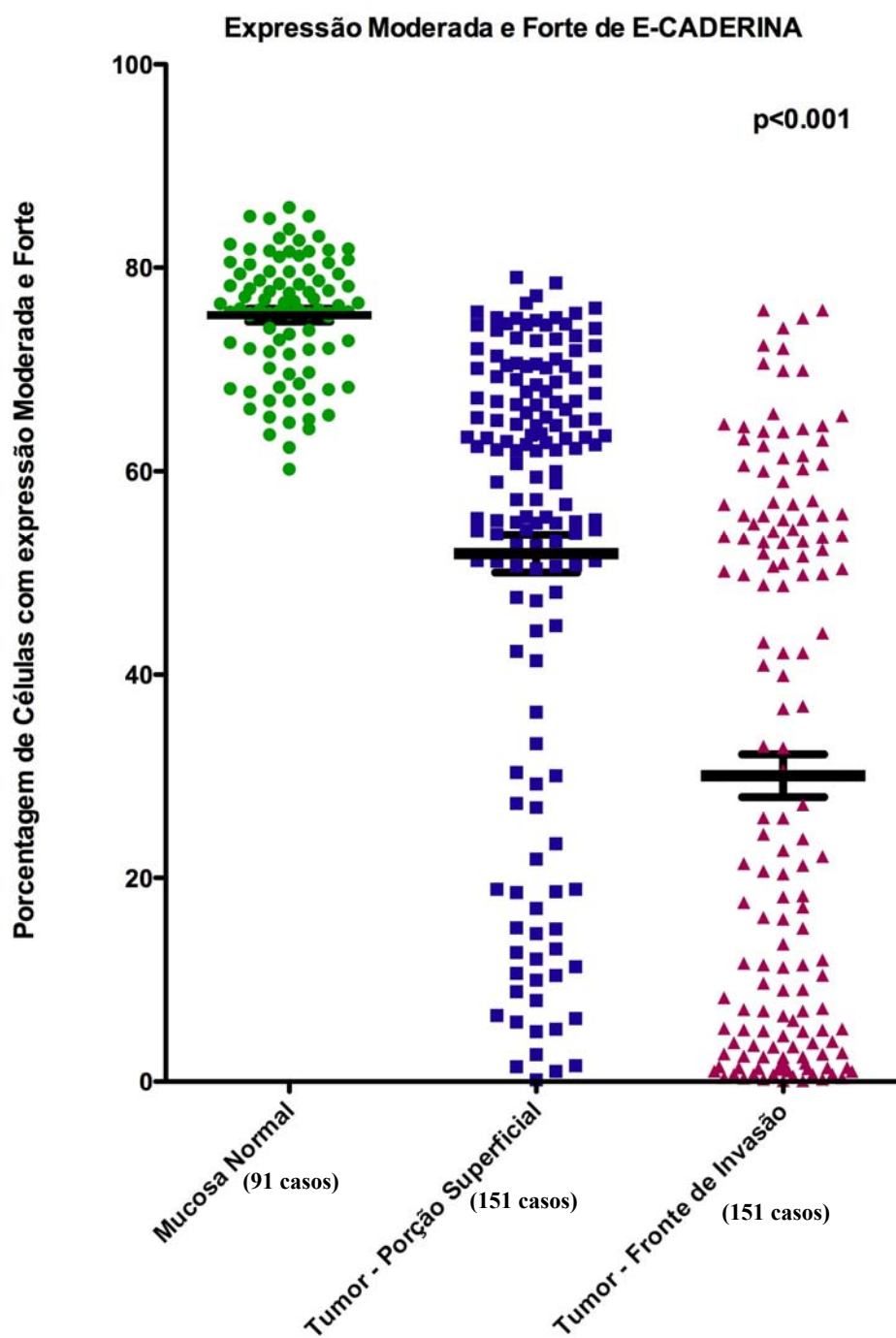


Figura 12 - Comparação entre os valores descritivos da expressão positiva de ECAD (2/3+) na MNN e TFI em amostras de CP.

4.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE EXPRESSÃO DE ECAD E PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Em relação ao grau de diferenciação histológica houve tendência de associação da expressão de ECAD no TPSC ($p=0.0712$). Entre os 40 casos bem diferenciados, 26 (65%) apresentaram expressão normal, 9 (22,5 %) mostraram perda discreta e 5 (12,5%) casos mostraram perda intensa de expressão. Dos 52 casos classificados como moderadamente diferenciados, 31 (60%) mostraram expressão normal, enquanto 10 (19%) mostraram perda discreta e 11 (21%), perda intensa. Dos 59 casos de tumores pouco diferenciados, 29 (49%) apresentaram expressão normal, 08 (13,5%) perda discreta e 22 (37,5%) casos mostraram perda intensa de ECAD. A Figura 13 representa a expressão de ECAD no tumor de acordo com o grau histológico (Tabela 4).

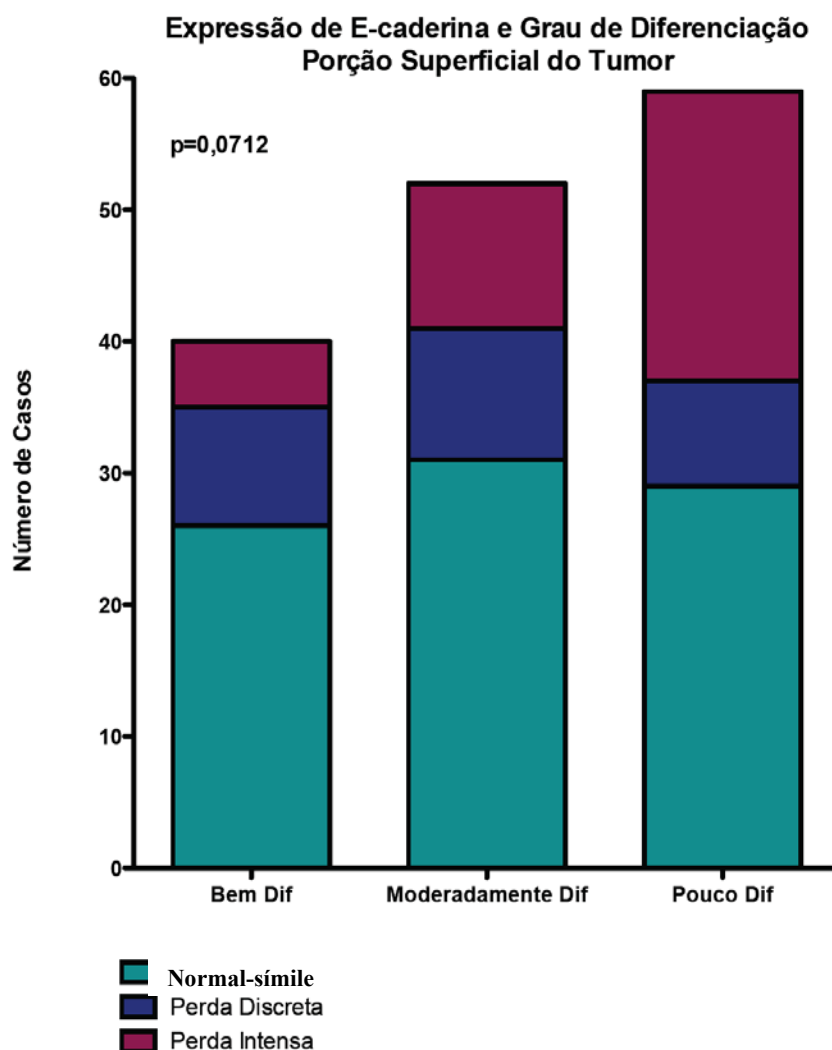


Figura 13 - Caracterização entre o grau de diferenciação histológica e expressão de ECAD no tumor na TPSC.

No TFI a expressão de ECAD foi associada ao grau de diferenciação histológica ($p < 0.0001$) (Tabela 4). Entre os tumores bem diferenciados a expressão foi normal em 06 (15%) casos, houve perda discreta de expressão em 21 (52,5%) casos e perda intensa em 13 (32,5%) casos. Entre os moderadamente diferenciados a expressão foi normal em 13 (25%) casos, houve perda discreta em 08 (15%) casos e perda intensa de expressão em 31 (60%) casos. Em tumores pouco diferenciados a

maior frequência foi observada em perda intensa de expressão 43 (73%) casos, e apenas 6 (10%) casos mostraram expressão normal e 10 (17 %) mostraram perda discreta (Figura 14).

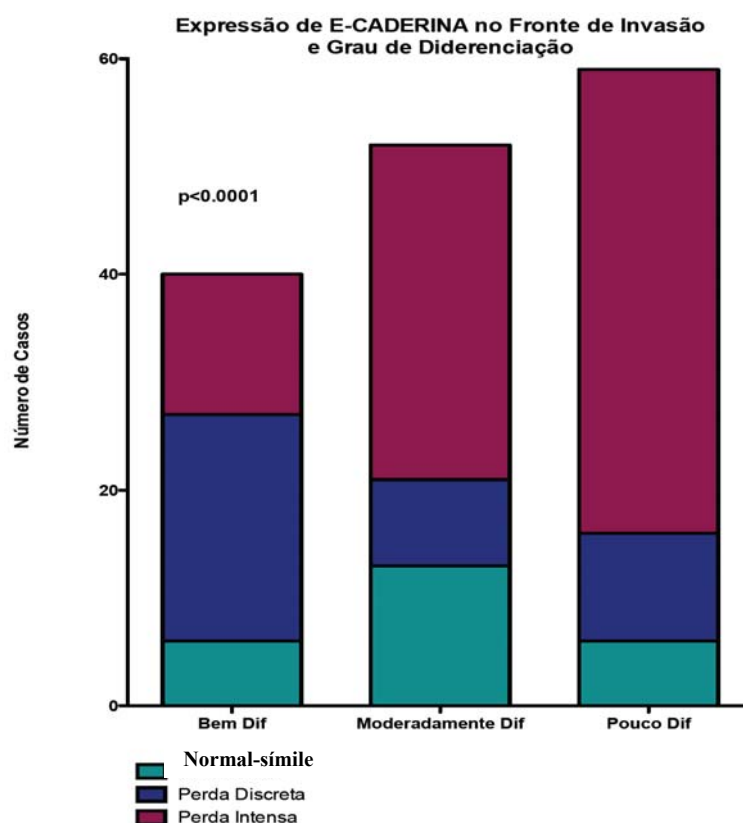


Figura 14 - Caracterização entre grau de diferenciação histológica e expressão de ECAD no TFI.

Em relação ao padrão de infiltração houve associação na TPSC ($p=0,0116$) e no TFI ($p=0,0003$). Na TPSC dos 33 casos de padrão bem delimitado, 22 (67%) apresentaram expressão normal, 9 (27%) casos apresentaram perda discreta de expressão, 2 (6%) casos mostraram perda intensa (Tabela 4) e dos 118 do tipo mal delimitado, a maior frequência de expressão de ECAD foi normal, 64 (54%) casos, enquanto que 18 (15,5%) casos apresentaram perda discreta de expressão, 36 (30,5

%) casos perda intensa de expressão. A Figura 15 mostra a expressão da ECAD na TPSC segundo o padrão infiltrativo.

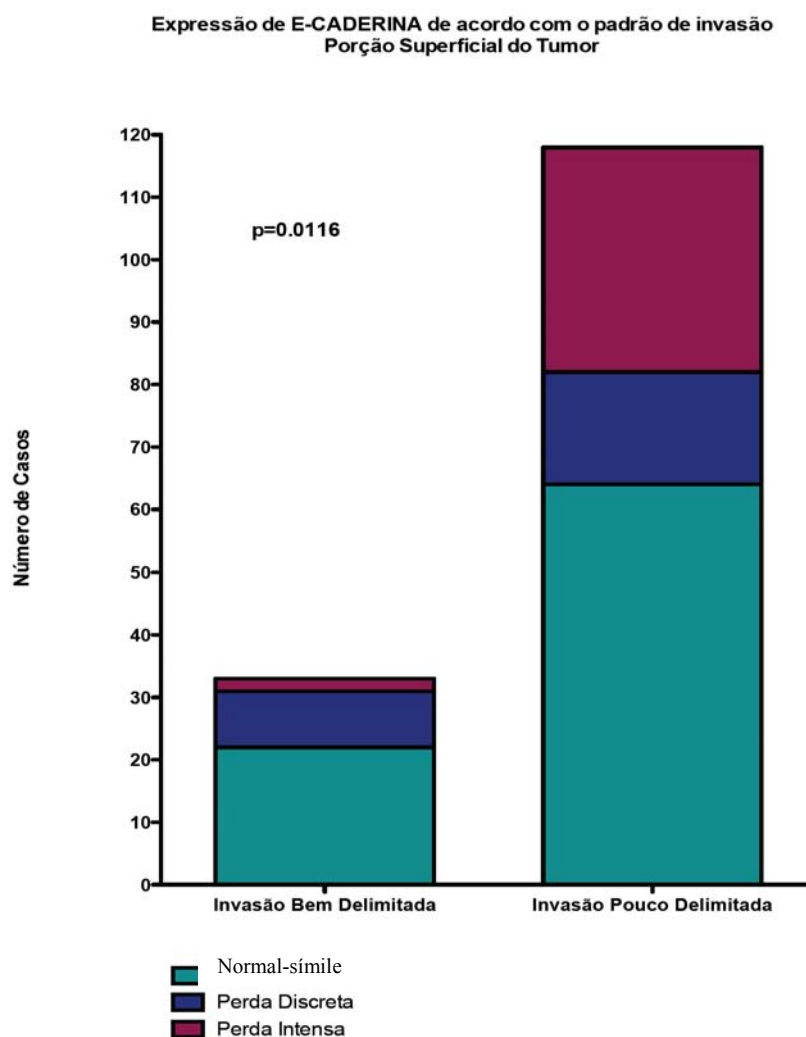


Figura 15 - Caracterização do padrão de infiltração e expressão de ECAD na TPSC.

Tabela 4 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e a expressão da proteína ECAD no TPSC e no fronte de invasão dos carcinomas de pênis.

Parâmetros Clínicos	Total de casos	Expressão de ECAD na TPSC				Expressão de ECAD no TFI			
		Normal	Perda discreta	Perda intensa	P valor	Normal	Perda discreta	Perda intensa	P valor
		n %	n %	n %		n %	n %	n %	
<u>Grau Histológico</u>									
Bem diferenciado	40	26 (65)	09 (22,5)	05 (12,5)	0,0712	06 (15)	21 (52,5)	13 (32,5)	< 0,0001
Moderadamente diferenciado	52	31 (60)	10 (19)	11 (21)		13 (25)	08 (15)	31 (60)	
Pouco diferenciado	59	29 (49)	08 (13,5)	22 (37,5)		06 (10)	10 (17)	43 (73)	
<u>Padrão Infiltrativo</u>									
Bem delimitado	33	22 (67)	09 (27)	02 (6,0)	0,0116	06 (18)	17 (51,5)	10 (30,5)	0,0003
Mal delimitado	118	64 (54)	18 (15,5)	36 (30,5)		19 (16)	22 (19)	77 (65)	
<u>Estadiamento T</u>									
T1	18	12 (67)	04 (22)	02 (11)	0,6458	04 (22)	07 (39)	07 (39)	0,2946
T2	93	52 (56)	15 (16)	26 (28)		17 (18)	20 (21,5)	56 (60,5)	
T3	40	22 (55)	08 (20)	10 (25)		04 (10)	12 (30)	24 (60)	
<u>Metástase Linfonodal</u>									
Sem metástase	110	64 (58)	19 (17,5)	27 (24,5)	0,8812	23 (21)	33 (30)	54 (49)	0,0067
Com metástase	41	22 (54)	08 (19)	11 (27)		2 (05)	06 (15)	33 (80)	
<u>Invasão Perineural</u>									
Sem invasão	116	71 (61)	22 (19)	23 (20)	0,0225	22 (19)	34 (29)	60 (52)	0,0284
Com invasão	35	15 (43)	05 (14)	15 (43)		03 (8,5)	05 (14,5)	27 (77)	
<u>Invasão Vascular</u>									
Sem invasão	112	65 (58)	20 (18)	27 (24)	0,8683	22 (20)	32 (28)	58 (52)	0,0425
Com invasão	39	21 (54)	07 (18)	11 (28)		03 (08)	07 (18)	29 (74)	

No TFI dos 33 casos do tipo bem delimitado, 6 (18%) casos apresentaram expressão normal-símile, 17 (51,5%) casos mostraram perda discreta e 10 (30,5 %) casos mostraram perda intensa de expressão. Já entre os 118 casos do tipo infiltrativo, a maior frequência de expressão foi nos casos com perda intensa, 77 (65 %), a expressão normal foi observada em 19 (16 %) casos e perda discreta em 22 (19 %) casos (Figura 16).

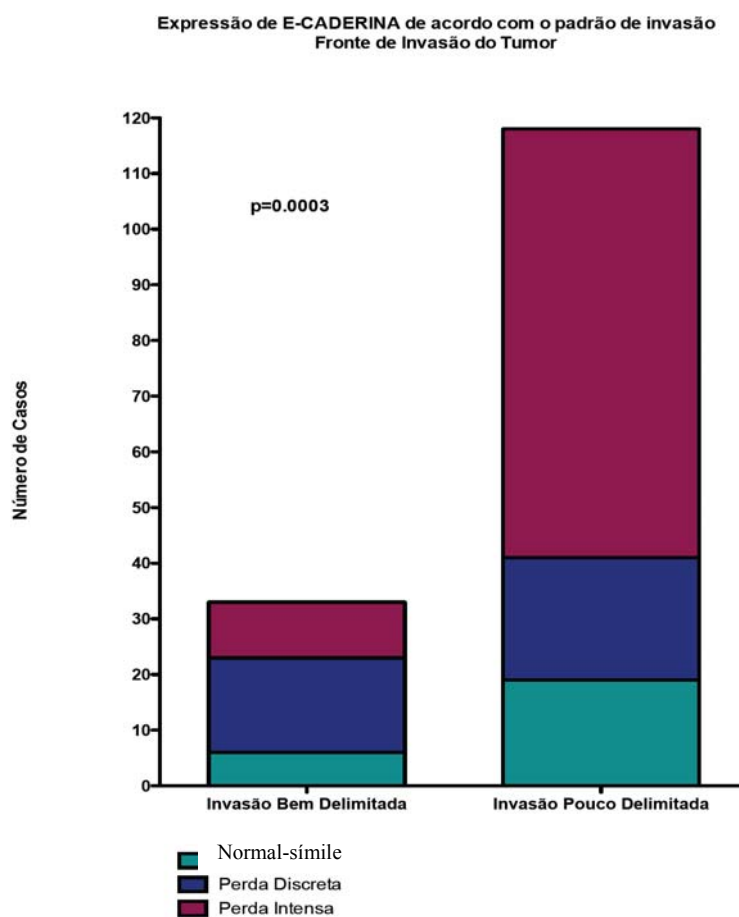


Figura 16 - Caracterização entre padrão de infiltração e expressão de ECAD no TFI.

As amostras tumorais não mostraram associação entre a expressão de ECAD e o estadió T na TPSC ($p=0.6458$) e no TFI ($p=0,2946$), há uma tendência que as

amostras T2 e T3 tenham maior frequência de perda intensa de expressão. Estes resultados descritivos estão apresentados na Tabela 4 e Figuras 17 e 18.

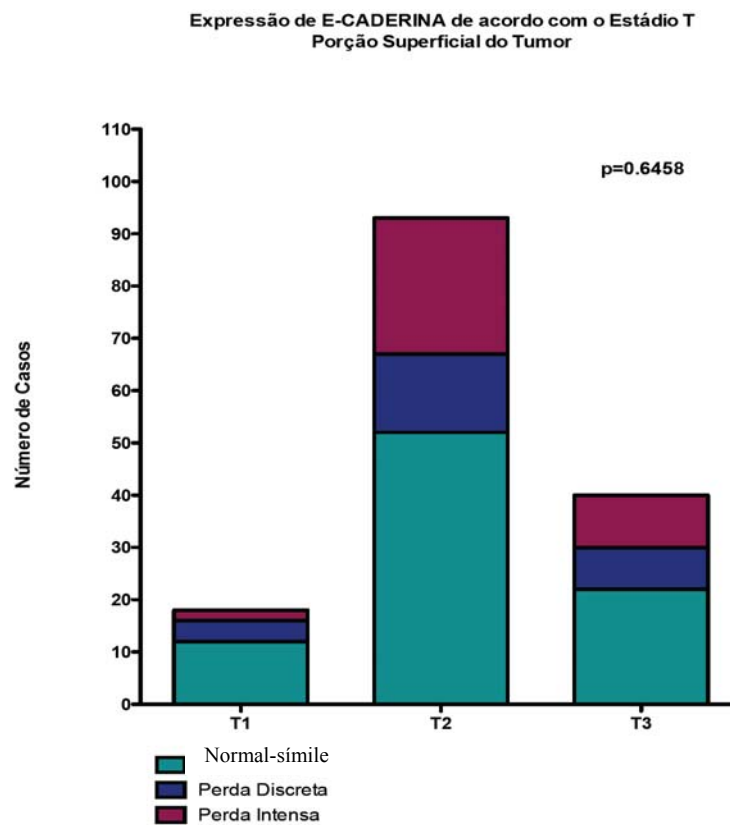


Figura 17- Caracterização entre estadio T e expressão de ECAD na TPSC.

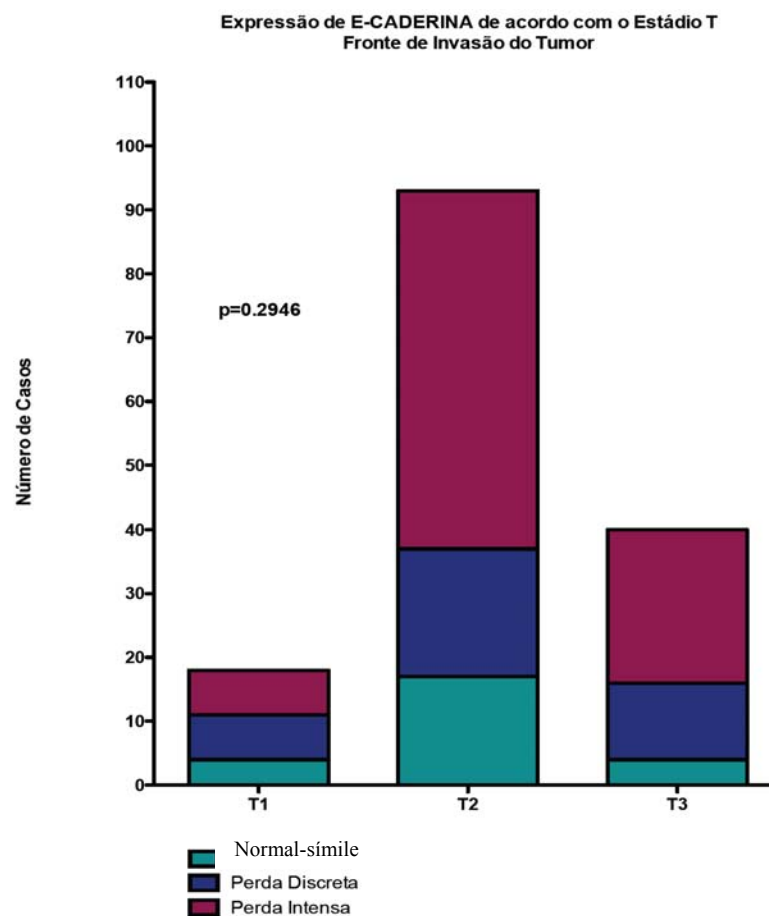


Figura 18 - Caracterização entre estadio T e expressão de ECAD no TFI.

Avaliamos a expressão da ECAD e a frequência de metástase nos linfonodos na TPSC e não observamos associação ($p=0,8812$). Entre os 110 casos sem metástase, 64 (58 %) casos tiveram expressão normal, 19 (17,5 %) casos apresentaram perda discreta e 27 (24,5 %), perda intensa. Em relação aos 41 casos que apresentaram metástase nos linfonodos, a expressão normal foi em 22 (54 %) casos, a perda discreta em 08 (19 %) casos e 11 (27 %) casos revelaram perda intensa (Figura 19).

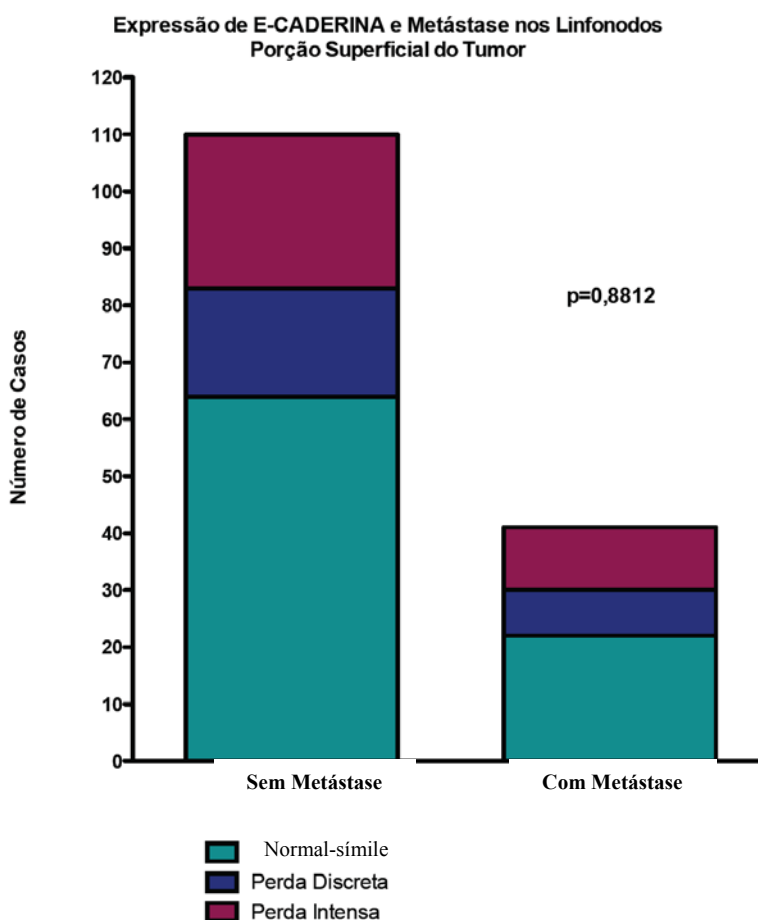


Figura 19 - Caracterização entre metástase nos linfonodos e expressão de ECAD na TPSC.

Ainda em relação à análise da metástase linfonodal, no TFI houve associação da expressão de ECAD (0,0067). Entre os 110 casos de linfonodos sem metástase, houve aumento da frequência da expressão de ECAD. Em 23 (21%) casos apresentaram expressão normal, 33 (30%) casos apresentaram perda discreta e 54 (49%) casos perda intensa de expressão. Entre linfonodos com metástase, 33 (80%) casos apresentaram perda intensa de expressão, 2 (5%) casos apresentaram expressão normal, 6 (14%) casos apresentaram perda discreta (Figura 20).

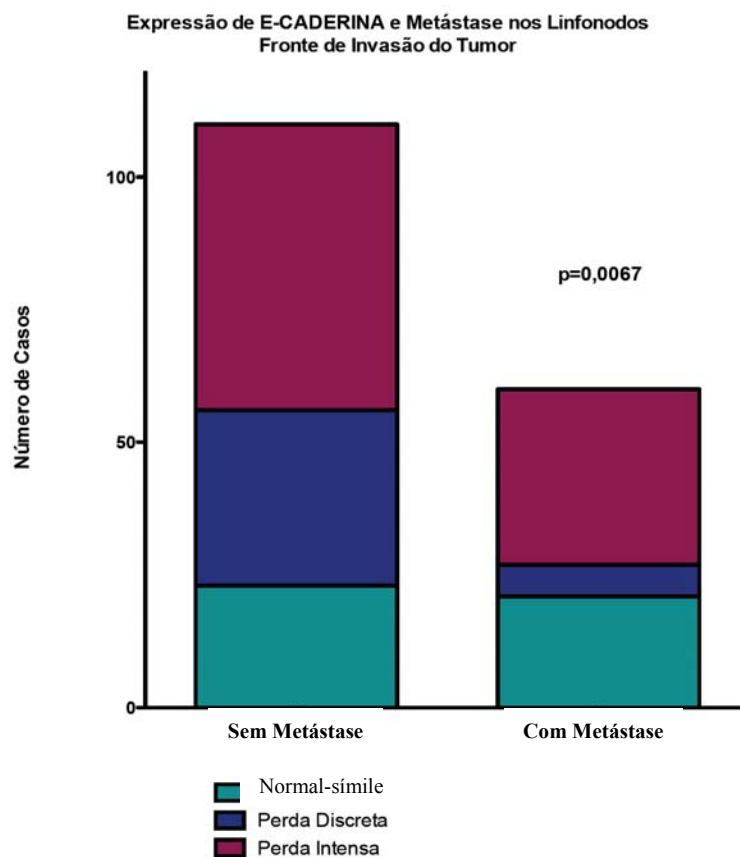


Figura 20 - Caracterização entre metástase nos linfonodos e expressão de ECAD no TFI.

A invasão perineural foi associada à expressão de ECAD no TPSC ($p=0,0225$). Nos tumores sem IPN, foi observada a maior porcentagem de frequência de expressão normal, 71 (61%) dos casos, enquanto que a perda (discreta e intensa) foi observada em menor frequência, 22 (19%) e 23 (20%), respectivamente. No TFI houve associação significativa ($p=0,0284$), onde observamos que a porcentagem na frequência de expressão aumentou de acordo com a progressão. Entre os 116 casos sem IPN, 22 (19%) casos expressaram ECAD normal, 34 (29%) dos casos expressaram perda discreta e 60 (52 %) casos expressaram perda intensa de ECAD. Entre os 35 casos com IPN, a porcentagem de frequência foi ainda mais expressiva

em relação à perda intensa, 27 (77%), enquanto apenas 3 (8,5%) dos casos expressaram ECAD normal e 5 (14,5%) casos expressaram perda discreta de ECAD. Estes resultados descritivos podem ser vistos na Tabela 4 e Figuras 21 e 22.

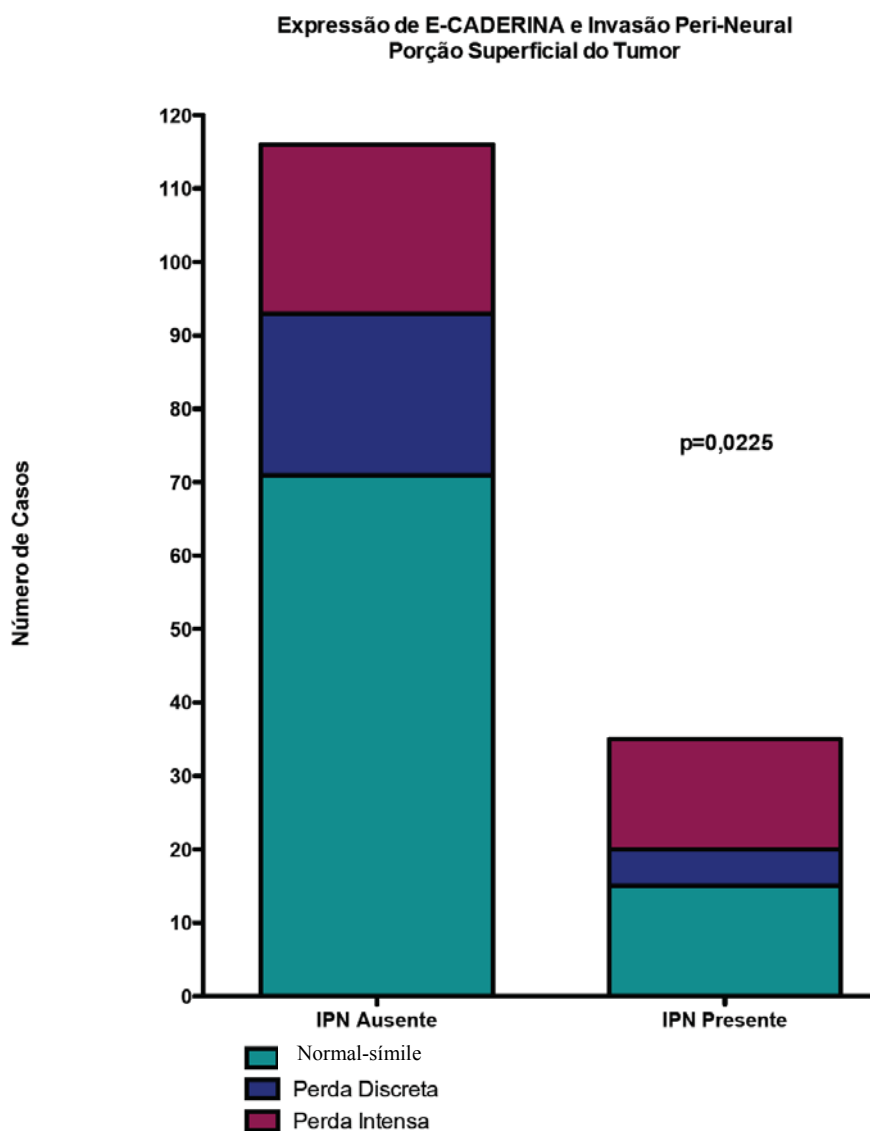


Figura 21 - Caracterização de Invasão Perineural e expressão de ECAD na TPSC.

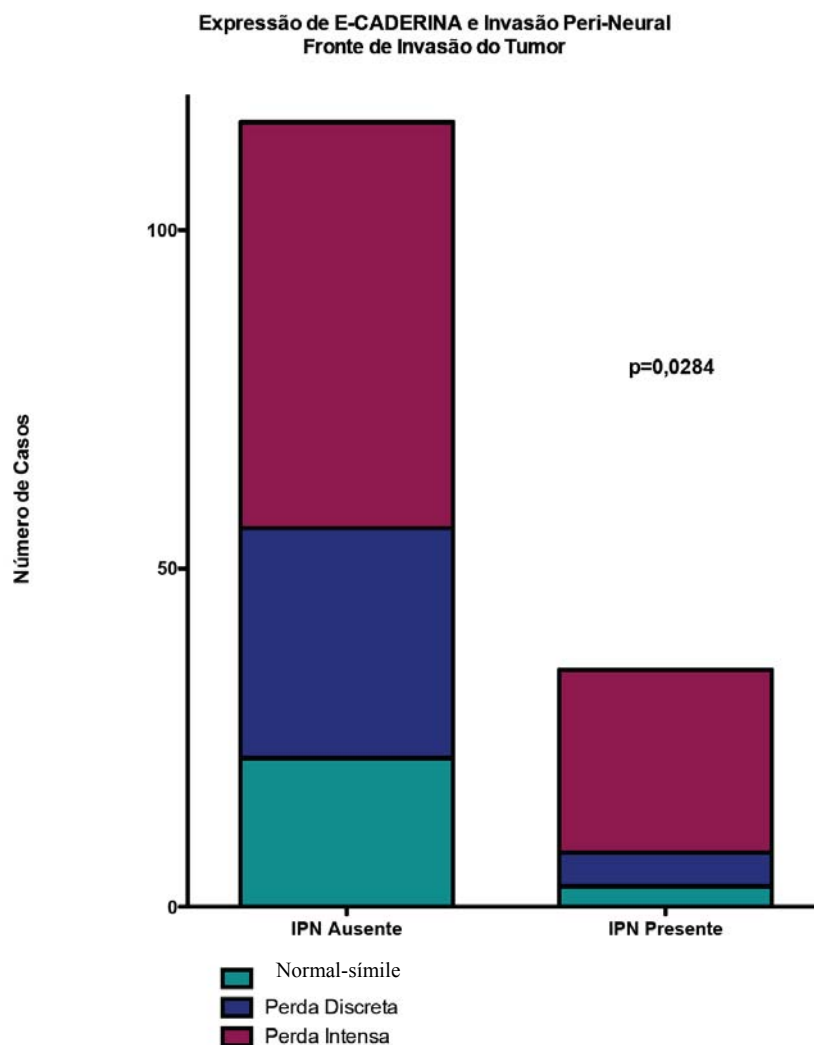


Figura 22 - Caracterização de invasão perineural e expressão de ECAD no TFI.

Em relação a IV não houve associação entre a expressão de ECAD na TPSC ($p=0,8683$) (Tabela 4). Contudo, no TFI houve associação ($p=0,0425$). Entre os 112 casos sem invasão vascular, 22 (20%) casos expressaram ECAD normal, 32 (28%) casos apresentaram perda discreta de ECAD e 58 (52%) casos expressaram perda intensa de ECAD. Entre os 39 casos com invasão vascular, 3 (8%) casos expressaram ECAD normal, 7 (18%) casos apresentaram perda discreta de ECAD e 29 (74%)

casos apresentaram perda intensa. A apresentação gráfica deste resultado pode ser observada nas Figuras 23 e 24.

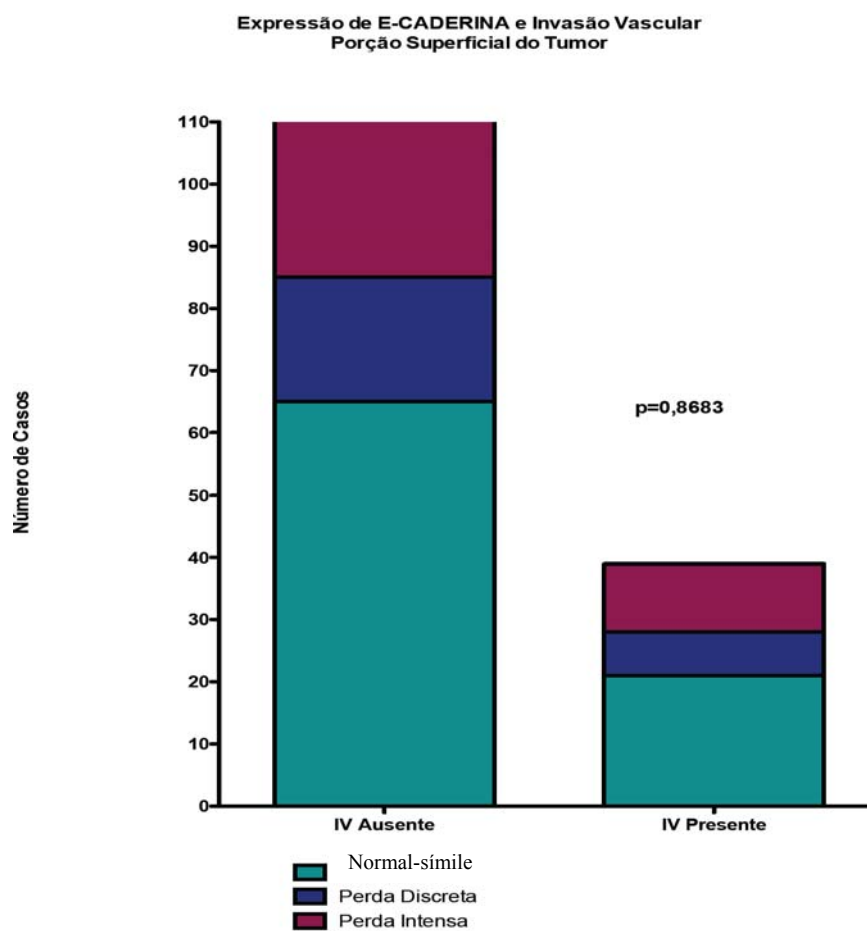


Figura 23 - Caracterização de invasão vascular e expressão de ECAD na TPSC.

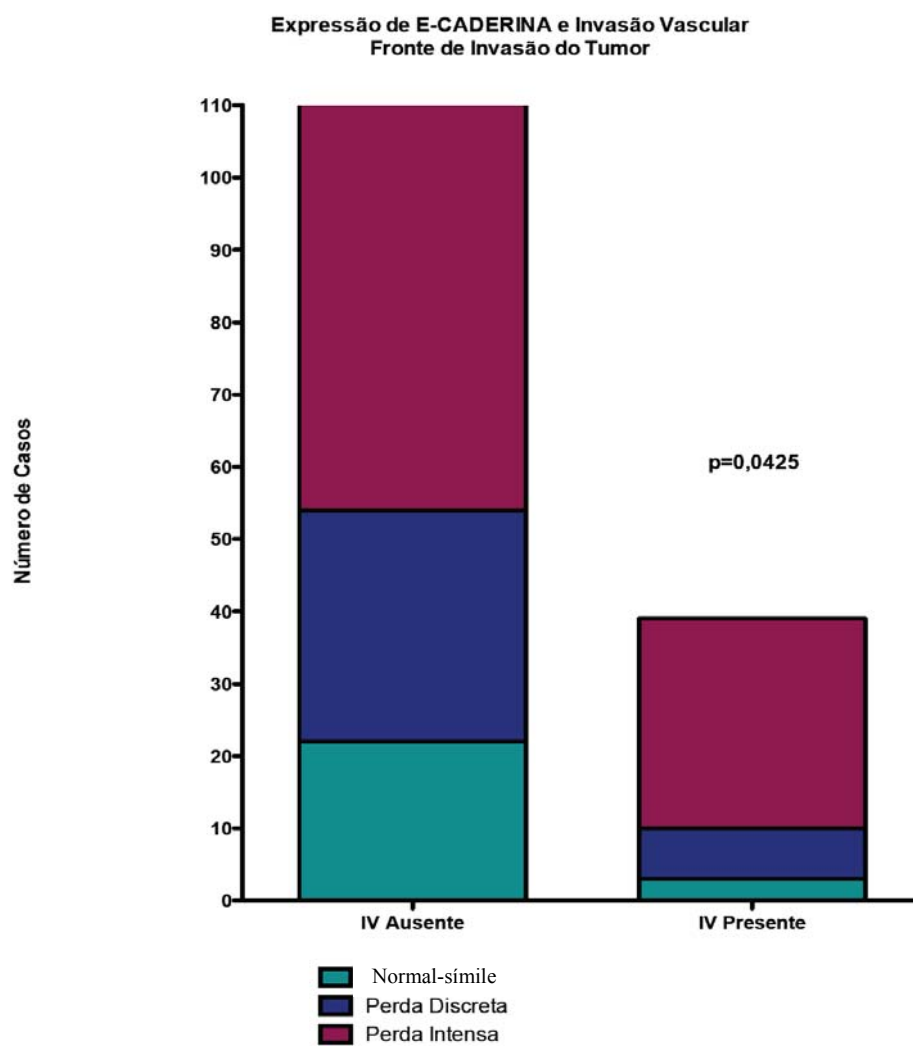


Figura 24 - Caracterização de invasão vascular e expressão de ECAD no TFI.

Tabela 5 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e a expressão da proteína ECAD na TPSC e no TFI agrupada, como expressão normal e perda discreta *versus* perda intensa.

Parâmetros Clínicos	Total casos	Expressão de ECAD na TPSC			Expressão de ECAD no TFI		
		Normal + Perda discreta	Perda intensa	p-valor	Normal + Perda discreta	Perda intensa	p-valor
		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<u>Grau Histológico</u>							
Bem diferenciado	40	35 (87,5)	05 (12,5)	0,015	27 (67,5)	13(32,5)	< 0,001
Moderadamente diferenciado	52	41 (78,8)	11 (21,2)		21 (40,4)	31 (59,6)	
Pouco diferenciado	59	37 (62,7)	22 (37,3)		16 (27,1)	43 (72,9)	
<u>Padrão Infiltrativo</u>							
Bem delimitado	33	31 (93,9)	02 (6,1)	0,004	23 (69,7)	10 (30,3)	< 0,001
Mal delimitado	118	82 (69,5)	36 (30,5)		41 (34,8)	77 (62,2)	
<u>Estadiamento T</u>							
T1	18	16 (88,9)	02 (11,1)	0,321	11 (61,1)	07 (38,9)	0,230
T2	93	67 (72,0)	26 (28,0)		37 (39,8)	56 (60,2)	
T3	40	30 (75,0)	10 (25,0)		16 (40,0)	24 (60,0)	
<u>Metástase Linfonodal</u>							
Sem metástase	110	83 (75,4)	27 (24,6)	0,774	56 (50,9)	54 (49,1)	0,001
Com metástase	41	30 (73,2)	11 (26,8)		8 (19,5)	33 (80,5)	
<u>Invasão Perineural</u>							
Sem invasão	116	93 (80,2)	23 (19,8)	0,006	56 (48,3)	60 (51,7)	0,008
Com invasão	35	20 (57,1)	15 (42,9)		8 (22,9)	27 (77,1)	
<u>Invasão Vascular</u>							
Sem invasão	112	85 (75,9)	27 (24,1)	0,612	54 (48,2)	58 (51,8)	0,014
Com invasão	39	28 (71,8)	11 (28,2)		10 (25,6)	29 (74,4)	

A Tabela 5 mostra a associação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão de ECAD, agrupada como expressão normal e perda discreta *versus* perda intensa.

Pode-se notar que há poucas diferenças em relação à análise de três grupos. De modo geral as diferenças ficam mais marcantes. A única diferença importante é que a relação da significância entre a diferenciação histológica e expressão de ECAD passa a ser significativa ($p=0.015$), enquanto que na análise de 3 grupos mostrava apenas tendência a significância ($p=0.0712$).

4.3 ASSOCIAÇÕES ENTRE A EXPRESSÃO DE VIMENTINA E PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

A expressão de vimentina foi associada ao grau de diferenciação histológica ($p=<0,0001$). Entre os 40 casos bem diferenciados, 39 (97,5%) casos foram negativos para vimentina e 1 (2,5%) caso apresentou expressão positiva. Entre os 52 casos moderadamente diferenciados, 34 (65%) casos foram negativos para vimentina e 18 (35%) casos foram positivos. Entre os 59 casos pouco diferenciados, 26 (44%) casos foram negativos para vimentina e 33 (56%) casos apresentaram expressão positiva. Estes resultados podem ser apreciados na Tabela 6 e Figura 25.

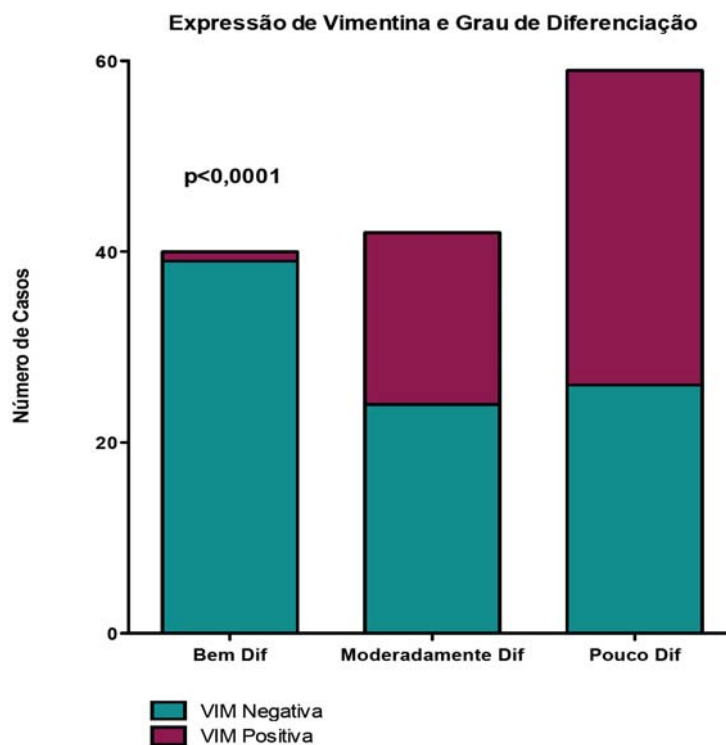


Figura 25 - Caracterização do grau de diferenciação histológica e expressão de vimentina.

A expressão de vimentina foi associada ao padrão infiltrativo ($p < 0,0001$). Entre os 33 casos no tipo bem delimitado, 31 (94%) casos não apresentaram expressão e apenas 2 (6%) casos mostraram marcação positiva. Dos 118 casos do tipo mal delimitado, 68 (58%) casos não apresentaram expressão e 50 (42%) casos mostraram expressão (Tabela 6; Figura 26).

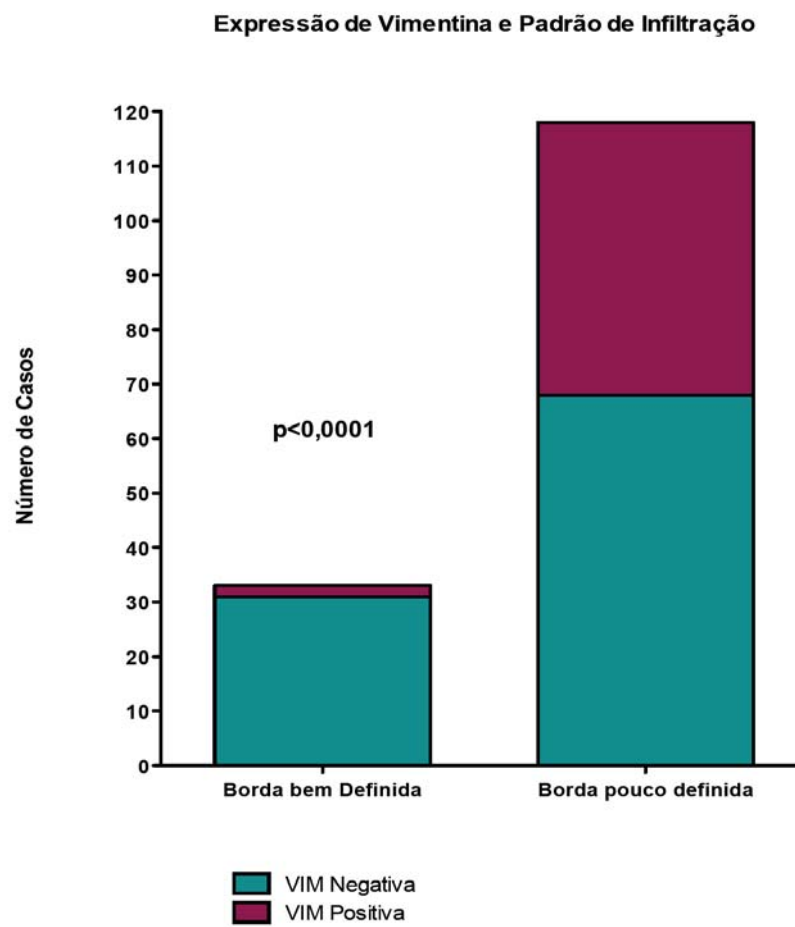


Figura 26 - Caracterização entre o padrão de infiltração e expressão de vimentina.

Tabela 6 — Associação entre variáveis clínico-patológicas e a expressão da proteína vimentina nos carcinomas de pênis.

Parâmetros Clínicos	Total de casos	Expressão de Vimentina no tumor				P value
		Negativo		Positivo		
		n	%	n	%	
<u>Grau Histológico</u>						
Bem diferenciado	40	39	(97,5)	01	(2.5)	< 0,0001
Moderadamente diferenciado	52	34	(65)	18	(35)	
Pouco diferenciado	59	26	(44)	33	(55)	
<u>Padrão Infiltrativo</u>						
Bem delimitado	33	31	(94)	02	(6)	< 0,0001
Mal delimitado	118	68	(58)	50	(42)	
<u>Estadiamento</u>						
T1	18	13	(72)	05	(28)	< 0,0001
T2	93	61	(65)	32	(35)	
T3	40	25	(63)	15	(37)	
<u>Metástase Linfonodal</u>						
Sem metástase	110	88	(80)	22	(20)	< 0,0001
Com metástase	41	11	(27)	30	(73)	
<u>Invasão Perineural</u>						
Sem invasão	116	82	(71)	34	(29)	0,0246
Com invasão	35	17	(49)	18	(51)	
<u>Invasão vascular</u>						
Sem invasão	112	83	(74)	29	(26)	0,0003
Com invasão	39	16	(41)	23	(59)	

A expressão de vimentina foi associada ao estadio T ($p=0,0001$). Entre os 18 casos de T1, 13 (72%) casos foram negativos para vimentina e 5 (27%) casos apresentaram expressão positiva. Dos 93 casos de T2, 61 (65%) casos foram negativos para vimentina e 32 (35%) casos foram positivos. Entre os 40 casos de T3,

25 (63%) casos foram negativos para vimentina e 15 (37%) casos apresentaram expressão positiva (Tabela 6; Figura 27).

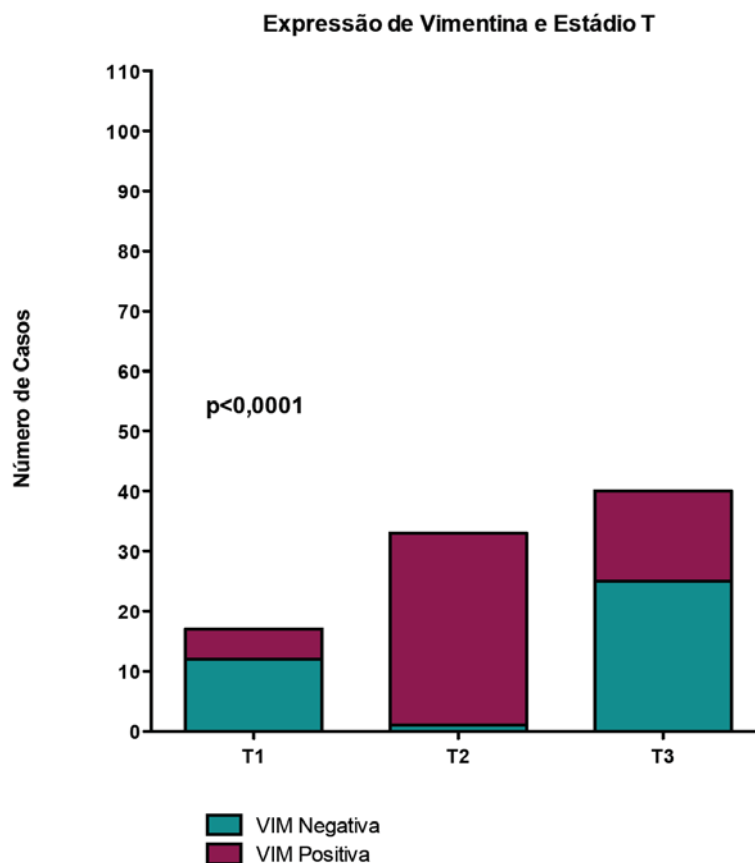


Figura 27 - Caracterização entre estadio T e expressão de vimentina.

A associação entre a expressão de vimentina foi associada à metástase nos linfonodos ($p < 0,0001$). Entre os 110 casos de linfonodos sem metástase, 88 (80%) casos não apresentaram expressão e 22 (20%) casos apresentaram expressão positiva. Entre os 41 casos de linfonodos com metástase, 11 (27%) foram negativos para vimentina e 30 (73%) positivos (Tabela 6, Figura 28).

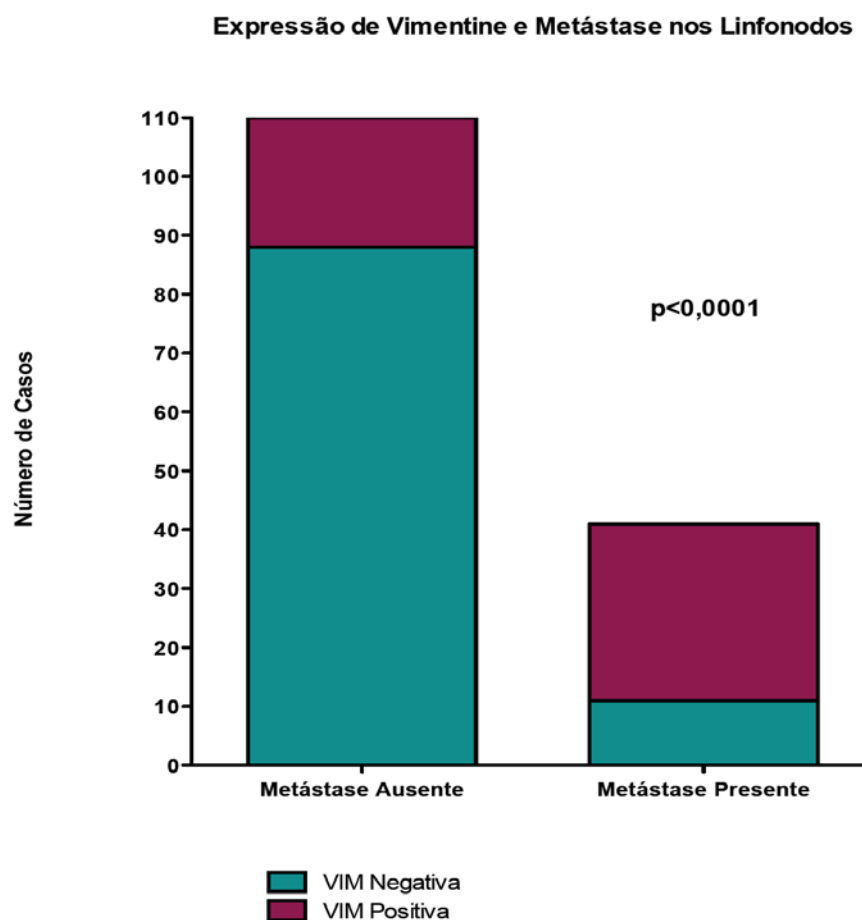


Figura 28 - Caracterização do status linfonodal e expressão de vimentina.

A expressão de vimentina foi associada a IPN (0.0246). Entre os 116 casos sem IPN, 82 (71%) casos não apresentaram expressão e 34 (29%) casos apresentaram expressão. Entre os 35 casos com IPN, 17 (49%) casos foram negativos para vimentina e 18 (51%) casos foram positivos (Tabela 6, Figura 29).

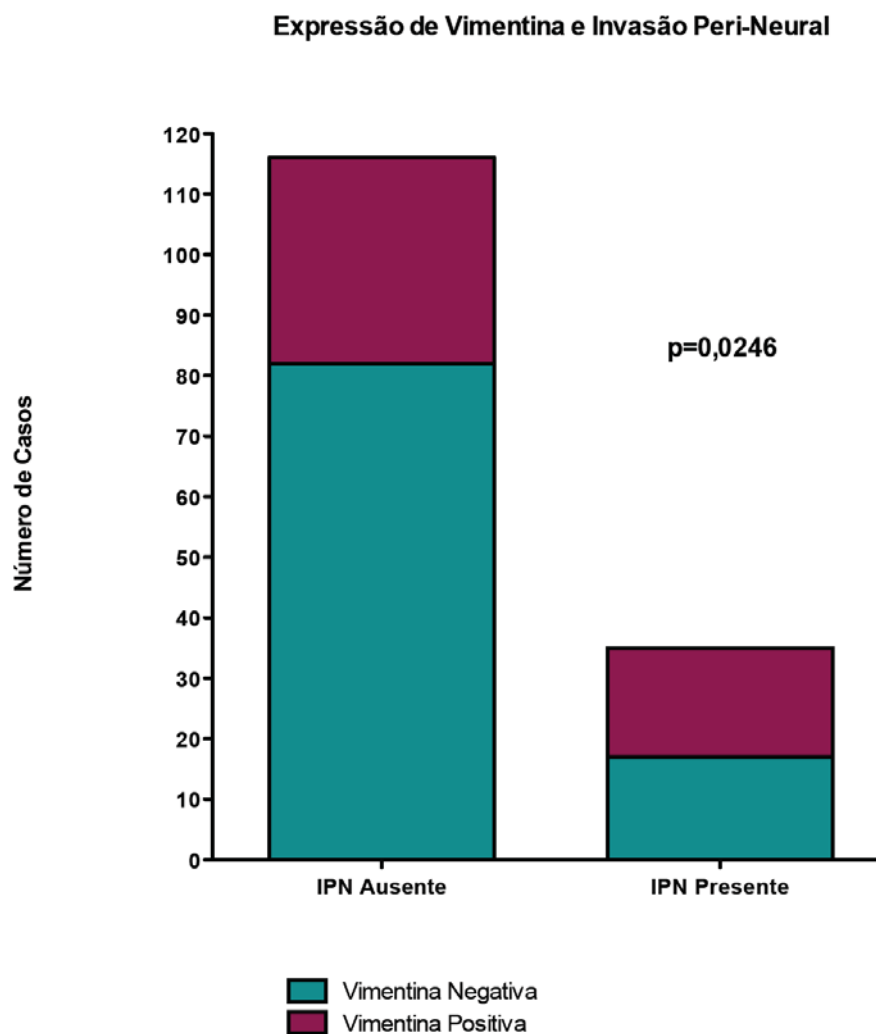


Figura 29 - Caracterização de invasão perineural e expressão de vimentina.

A expressão de vimentina também foi associada a IV ($p=0.0003$). Entre os 112 casos sem IV, 83 (74%) casos não apresentaram expressão e 29 (26%) mostraram expressão da proteína. Entre os 39 casos com presença de IV, 16 (41%) casos foram negativos para vimentina e 23 (59%) casos foram positivos (Tabela 6, Figura 30).

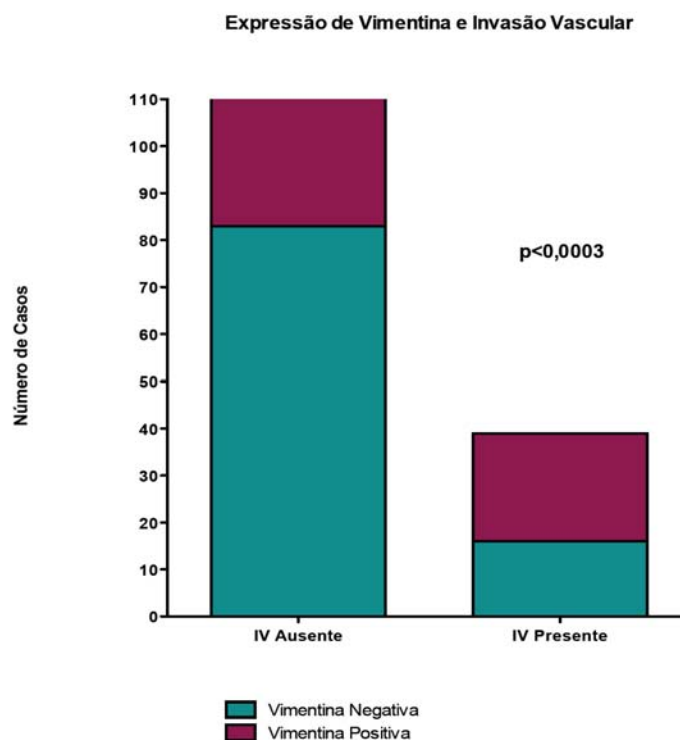


Figura 30 - Caracterização entre invasão vascular e expressão de vimentina.

As figuras abaixo mostram a expressão imuno-histoquímica da proteína vimentina. A Figura 31 mostra a expressão positiva, a Figura 32 mostra a expressão imuno-histoquímica da proteína vimentina em blocos infiltrativos e a Figura 33 mostra a expressão negativa da vimentina.

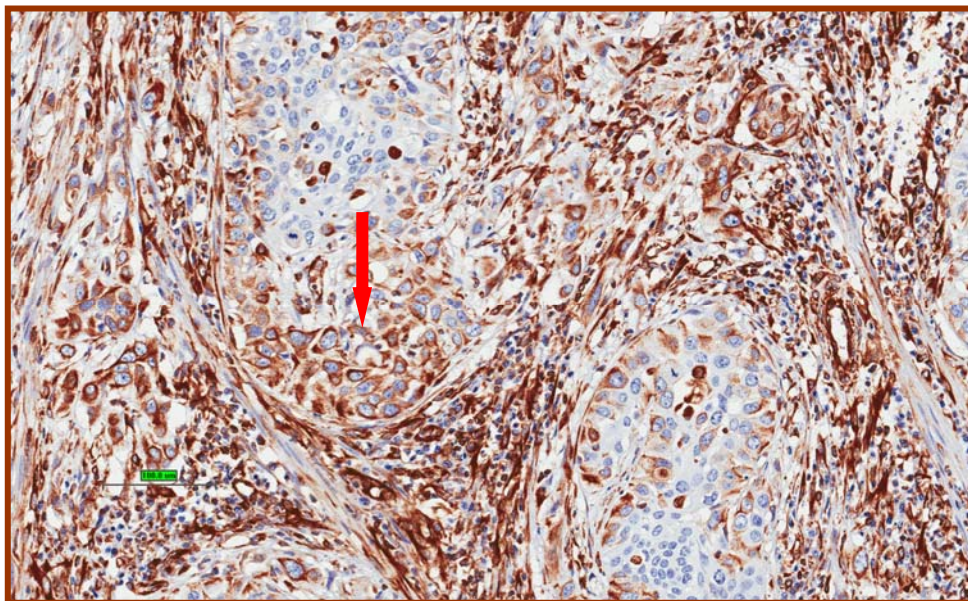


Figura 31 - Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando expressão positiva para vimentina em células neoplásicas de CP.

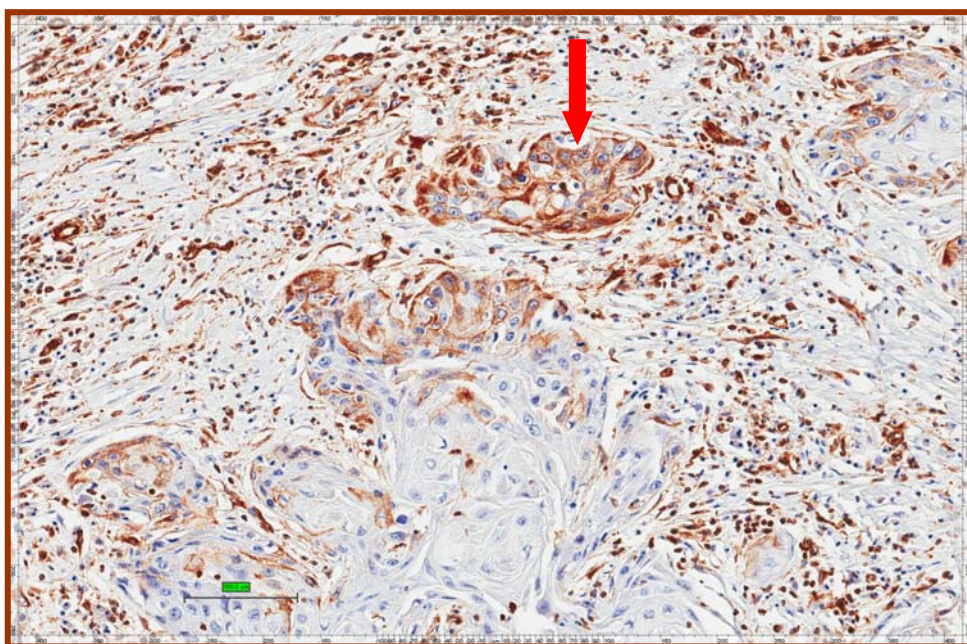


Figura 32 - Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando expressão de vimentina em células isoladas de CP.

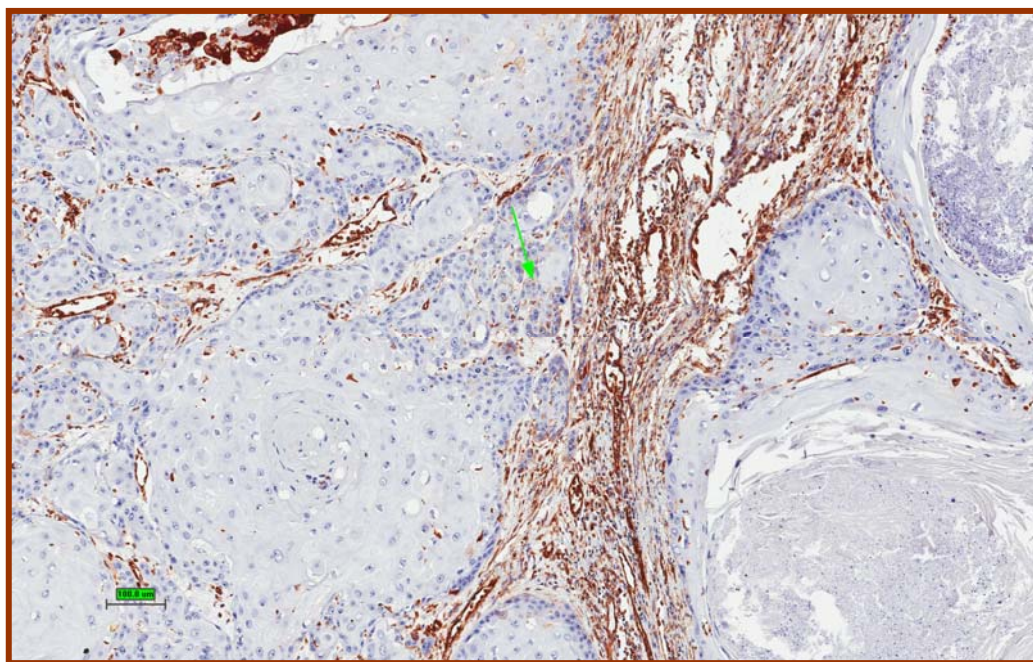


Figura 33 - Representação da reação de imuno-histoquímica mostrando expressão negativa de vimentina em CP.

4.4 ANÁLISE DA SOBREVIDA

4.4.1 Análise Univariada

4.4.2 Curvas de sobrevida de acordo com a expressão de ECAD

Sobrevida Câncer Específica

Dentre as variáveis de importância avaliadas para a sobrevida câncer específica foram estatisticamente significantes a expressão da vimentina ($p < 0,001$), ECAD no TFI ($p < 0,001$), a presença de metástase linfonodal ($p < 0,001$), a presença de IV ($p < 0,001$), a IPN ($p < 0,001$), o grau de diferenciação histológica ($p = 0,001$) e o padrão de infiltração ($p = 0,002$).

Na expressão da ECAD na TPSC ($p=0,5732$), os pacientes que apresentaram expressão normal e perda discreta de ECAD mostraram sobrevida de aproximadamente 75%, enquanto que os pacientes com perda intensa tiveram sobrevida em aproximadamente 60% dos casos (Figura 34). Quando analisado o TFI, os pacientes com perda intensa de expressão de ECAD tiveram a menor sobrevida câncer-específica (60%), enquanto expressão normal e perda discreta apresentaram sobrevida de aproximadamente 90% em 10 anos ($p=0,0005$), Figura 35.

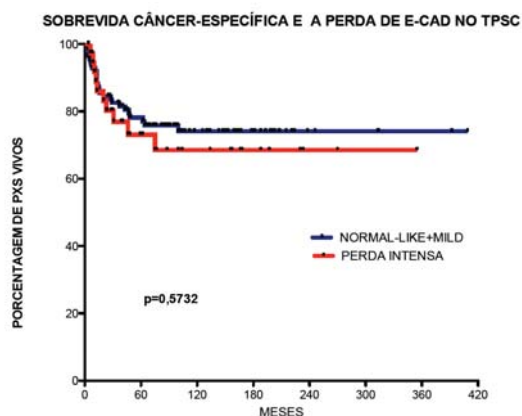


Figura 34 - Curvas de sobrevida câncer específica de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD na TPSC.

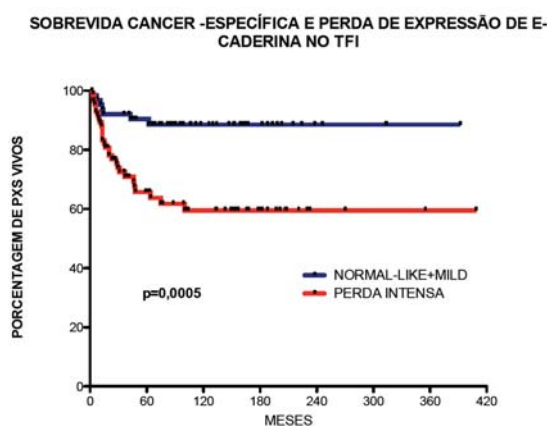


Figura 35 - Curvas de sobrevida câncer específica de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD no TFI.

Sobrevida Global

Dentre as variáveis de importância avaliadas para sobrevida global foram estatisticamente significantes a expressão da vimentina ($p<0,001$), ECAD no TFI ($p<0,001$), a presença de metástase linfonodal ($p<0,001$), a presença de invasão vascular linfática ($p<0,001$), a invasão perineural ($p<0,001$), e o grau de diferenciação histológica ($p<0,001$).

A Figura 36 mostra a curva de sobrevida global quando comparados os casos com expressão normal-simile + perda discreta e os casos com perda intensa medidas no TPSC. Pode-se notar que cerca de 50% dos pacientes com perda intensa da expressão de ECAD estavam vivos em 10 anos, enquanto que este índice era de 70% nos pacientes com perda discreta + normal-simile, diferença que não foi suficiente para atingir significância estatística ($p=0,3839$).

Em relação à perda da expressão de ECAD no TFI, a curva de sobrevida global pode ser vista na Figura 37. Notadamente, os casos que tiveram perda intensa da expressão de ECAD evoluíram menos ($p=0,0025$).

SOBREVIDA GLOBAL E PERDA DE EXPRESSÃO DE E-CADERINA NO TPSC

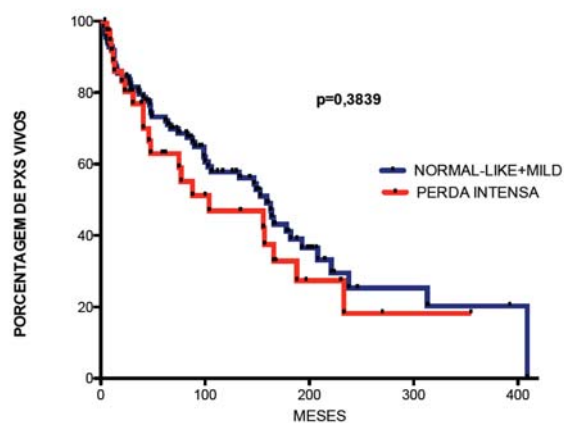


Figura 36 - Curva de sobrevida global de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD na TPSC.

SOBREVIDA GLOBAL E PERDA DE EXPRESSÃO DE E-CADERINA NO TFI

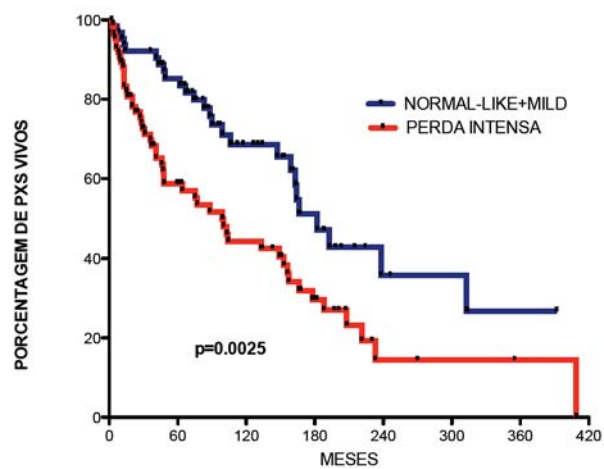


Figura 37 - Curva de sobrevida global de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD no TFI.

Sobrevida Livre de Doença

Na sobrevida livre de doença (SLS), como demonstrado nas Figuras 38 e 39, foram comparados a expressão de ECAD na TPSC (0,2152) e no TFI ($p=0,0001$) e os resultados foram, que no TFI os pacientes em que a expressão de ECAD se apresenta com perda intensa tem sobrevida menor que 50% em 10 anos do que na TPSC que os pacientes apresentaram aproximadamente 70% de sobrevida. Os pacientes que mostraram expressão normal e perda discreta de ECAD na TPSC, a porcentagem está muito próxima dos pacientes com perda intensa de aproximadamente 60% considerando melhor sobrevida, do que no TFI que mostra que os pacientes com expressão normal e perda discreta tem melhor sobrevida de aproximadamente 90% do que os pacientes com perda intensa 50%.

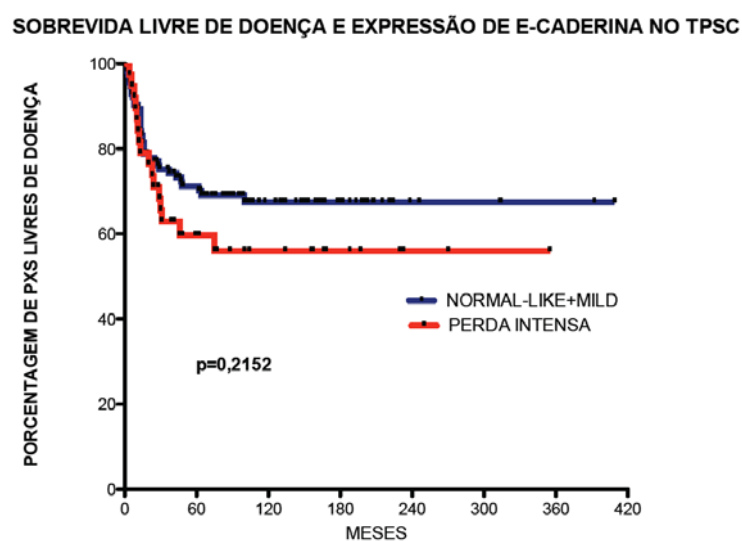


Figura 38 - Curva de sobrevida livre de doença de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD na TPSC.

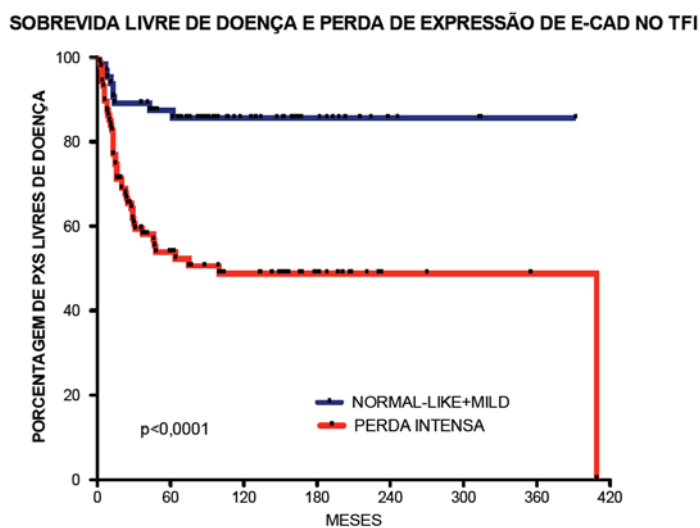


Figura 39 - Curva de sobrevida livre de doença de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína ECAD no TFI.

4.4.3 Curvas de Sobrevida de acordo com a Expressão de Vimentina

Em relação à expressão da proteína vimentina, foi observado que os pacientes com vimentina negativa mostraram maior sobrevida global em 10 anos (70%) do que os pacientes com maior expressão de vimentina positiva (<30%) [($p < 0,0001$), (Figura 40)]. Resultados semelhantes foram encontrados na sobrevida câncer específica [($p < 0,0001$), (Figura 41)] e sobrevida livre de doença [($p < 0,0001$), (Figura 42)], onde se observa alta sobrevida em pacientes com expressão negativa de vimentina (90%) para SCE, e aproximadamente (90%) para SLD do que em relação a pacientes com expressão positiva (<30% para SCE e 20% SDL).

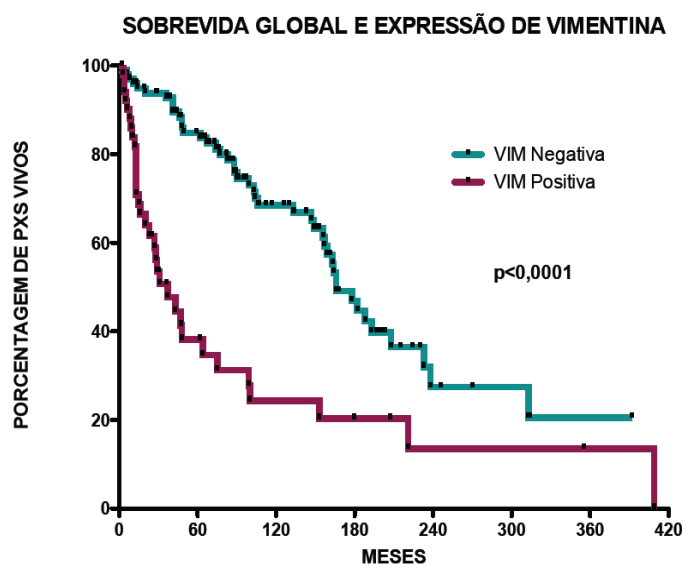


Figura 40 - Curvas de sobrevida global em 10 anos de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína vimentina.

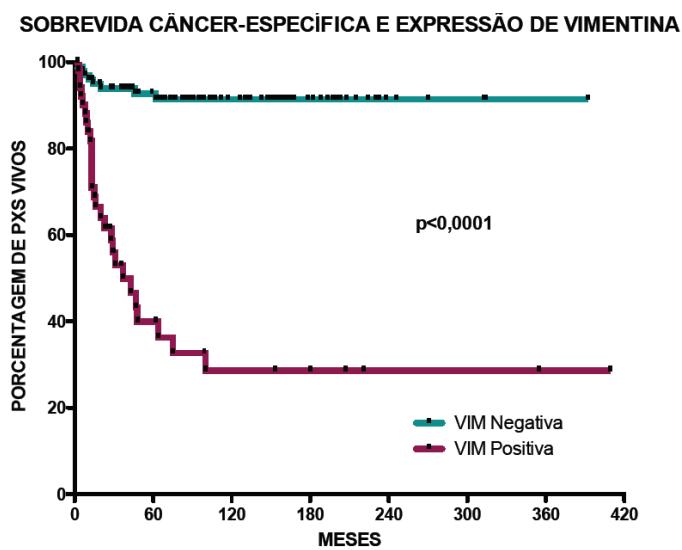


Figura 41- Curvas de sobrevida câncer específica em 10 anos de pacientes portadores CP em relação à expressão da proteína vimentina.

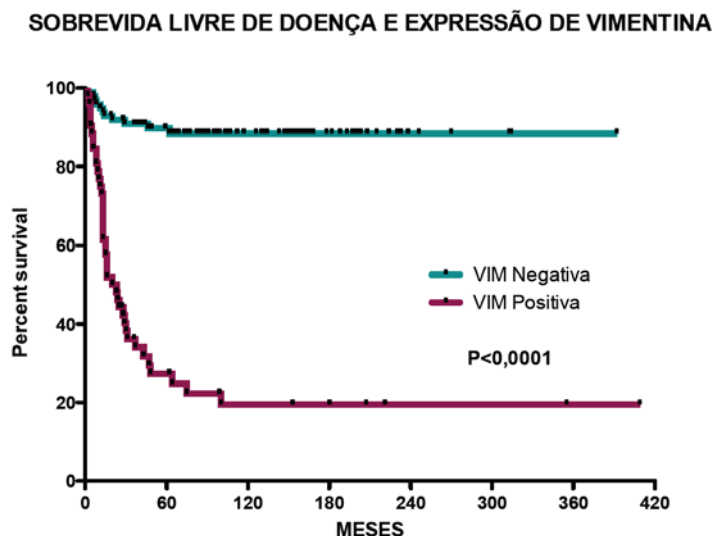


Figura 42 - Curvas de sobrevida livre de doença em 10 anos de pacientes portadores CP em relação à expressão da vimentina.

4.5 ANÁLISE MULTIVARIADA

4.5.1 Sobrevida Câncer Específica

As variáveis selecionadas para a análise multivariada foram as que se apresentaram estatisticamente significantes na análise univariada entre as variáveis previamente selecionadas e aquelas com p até 0,20.

Tabela 7 - Risco relativo para óbito específico e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) estimados pelo modelo de regressão de COX.

Variável	Categoria	N	RR	IC 95%	p-valor multivariado
Vimentina	Negativo	99	1,0	Ref	<0,001
	Positivo	52	7.676	[3.210-18,346]	
Metástase Linfonodal	Sem metástase	110	1,0	[1,320-5,774]	0,007
	Com metástase	41	2,761		

A expressão positiva da vimentina mostra cerca de sete vezes mais risco de óbito do que o negativo e semelhante resultado para a presença de metástase (Tabela 7).

4.5.2 Sobrevida Global

As variáveis selecionadas para a análise multivariada foram as que se apresentaram estatisticamente significantes na análise univariada entre as variáveis previamente selecionadas e aquelas com p até 0,20. (Tabela 8).

Tabela 8 - Risco relativo para óbito global e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) estimados pelo modelo de regressão de COX.

Variável	Categoria	N	RR (95% IC) bruto	RR (95% IC)	p-valor multivariado
Vimentina	Negativo	99	1,0 (ref.)	(ref)	0, 001
	Positivo	52	2,302	[1,405-3,772]	
Metastase	Sem metástase	110	1,0 (ref.)	(ref)	0, 002
Linfonodal	Com metástase	41	2,370	[1,366-4,113]	
Invasão	Sem invasão	116	1,0	(ref)	0, 027
Perineural	Com invasão	35	1,841	[1,073-3,158]	

5 DISCUSSÃO

O câncer de pênis é uma doença rara em nações desenvolvidas (GLOECKLER-RIES et al. 1990). No Brasil é considerado um importante problema de saúde e causa grande impacto psicológico. É mais freqüente a partir da sexta década de vida. A evolução do CP é insidiosa, com progressão loco-regional previsível. Esses tumores originam-se na glândula em 80% dos casos, no prepúcio, em 15% e, no sulco coronal, em 5% (DROLLER 1980). Entre os fatores prognósticos comprovados do CP estão o estadió, o tipo histológico, o grau histológico, a espessura do tumor, o nível de invasão, a embolização vascular e linfática, a invasão perineural, as metástases linfonodais e a expressão da p53 (LOPES et al. 2000; CUBILLA et al. 2001; GUIMARÃES et al. 2006). O conhecimento sobre os aspectos moleculares é ainda muito pequeno, e novas abordagens podem melhorar esta acuidade.

A EMT é um fenômeno fundamental durante a embriogênese e cicatrização de feridas (KALLURI e NEILSON 2003). Evidências recentes sugerem que os programas genéticos relevantes para EMT também estão transitoriamente ativadas em carcinomas (BOYER et al. 2000; THIERY 2002). Durante a EMT, células epiteliais perdem adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, migrando para outros locais e contribuindo para a progressão do câncer. A EMT parece conferir às células cancerosas a capacidade de se infiltrar no tecido e promover metástases para sítios distantes. Nessa fase de transição, uma célula epitelial polarizada passa por modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, adquirindo um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão, resistência a apoptose

aumenta (KALLURI e WEINBERG 2009). Essas modificações podem ser observadas através de estudos anatomopatológicos e estudos de imuno-histoquímica. Algumas moléculas com muita importância neste fenômeno são as moléculas de adesão celular, sendo a ECAD uma das mais importantes. A expressão da ECAD é necessária para a manutenção da integridade epitelial. Estudos indicam que a perda ou a expressão reduzida dessa molécula de adesão pode permitir ou aumentar o risco da progressão tumoral, o aumento da invasão e o desenvolvimento de metástase (PEINADO et al. 2004; ALBERTS et al. 2004; DERYCKE e BRACKE 2004; CAMPOS et al. 2006).

A vimentina, molécula presente no citoplasma de células mesenquimais, desempenha um papel importante, dando suporte e ancorando as organelas no citosol (DUTSCH-WICHEREK 2010). Além dessa função já bem conhecida, há evidências de que esse filamento exerça um papel regulatório em outras funções celulares envolvendo a adesão, migração e sinalização celular, tendo um papel essencial na transição epitélio-mesênquima (ALBERTS et al. 2004; IVASKA et al. 2007).

Analisando a expressão da ECAD, um dos mais importantes marcadores de EMT, devido ao envolvimento no processo de adesão celular, foi demonstrado que a média de células sem a expressão desta proteína é significativamente maior no TFI comparado com a TPSC e com a MNN adjacente ($p < 0,0001$). Esta perda de expressão de ECAD no fronte explica como essas células mais invasoras se desprendem mais facilmente umas das outras, o que facilita a invasão local.

A associação entre a perda de expressão de ECAD e um fenótipo celular mais agressivo já foi observada na literatura em estudos com outros carcinomas como cabeça e pescoço (incluindo estudos com carcinoma escamoso oral e de esôfago),

mama, pulmão e próstata (MATTIJSEN et al. 1993; VAN AKEN et al. 2001; GOULD ROTHBERG e BRACKEN 2006; STRUMANE et al. 2004; NATSUGOE et al. 2007; LIU et al. 2009; LIN et al. 2010).

CAMPOS et al. (2006) já tinham observado associação significativa entre a perda de ECAD e o risco aumentado de metástases linfonodais no CP, embora essa associação não tenha se mantido em análises multivariadas. Resultados semelhantes foram obtidos por ZHU et al. (2007), avaliando amostras de carcinoma de pênis. No presente estudo, a perda de expressão foi maior à medida que o tumor progredia; ou seja, diminuiu significativamente no tumor em comparação com a MNN, e no TFI em relação ao TPSC. Apesar dos estudos de CAMPOS et al. (2006) e ZHU et al. (2007) terem observado a associação da perda de expressão de ECAD com o risco de metástase linfonodal, a análise da expressão não foi realizada no fronte de invasão, e não há na literatura estudos que relatam esse tipo de análise. Enfatizamos a importância em fazer a análise em regiões diferentes, principalmente no fronte de invasão, justificando que o processo de EMT contribui para a progressão do tumor.

A diferença de expressão entre o TFI e o TPSC é um ponto importante a ser ressaltado. A média de células negativas no TFI foi quase três vezes superior à média de células negativas no TPSC. Isto pode significar que estudos que avaliaram a expressão somente no TPSC encontrem um fenótipo mais atenuado e negligenciem as células mais potencialmente invasoras.

A perda de expressão intensa de ECAD no tumor mostrou-se associada com o padrão de invasão tumoral. O padrão mal delimitado (tipo infiltrativo) apresentou maior perda de expressão deste marcador epitelial quando comparado com o padrão bem limitado. Ao avaliar a expressão no fronte, esta associação foi ainda mais forte.

Nesta região, mais de metade da amostra com padrão infiltrativo apresentou perda intensa de ECAD.

Esta variável também esteve associada com ganho de expressão de vimentina. Dos casos com padrão bem delimitado, apenas 6% foram positivos para o marcador, enquanto 42% dos casos infiltrativos apresentaram positividade ($p=0,0001$). No modelo de regressão logística o risco de ter vimentina positiva chega até a sete vezes para o padrão mal delimitado em relação ao padrão bem delimitado.

Em acordo com estes achados, o padrão de crescimento tumoral já foi demonstrado como fator prognóstico, quando se observou que pacientes que apresentavam o padrão de crescimento infiltrativo apresentavam risco de comprometimento linfonodal (GUIMARÃES et al. 2006).

Quando se avaliou o grau histológico, foi observada a associação da ECAD apenas no fronte de invasão ($p=0,0001$). Na TPSC, a associação não aconteceu, enquanto essas áreas histológicas ganharam significativamente expressão de vimentina ($p<0,001$). O grau de diferenciação histológico já foi citado na literatura como indicadores de pior prognóstico (SLATON et al. 2001; FICARRA et al. 2002; VELAZQUEZ et al. 2008). SLATON et al. (2001) estratificaram o risco de metástase linfonodal de acordo com a porcentagem de células tumorais indiferenciadas, mostrando maior risco para tumores com mais de 50% de indiferenciação.

A invasão vascular e linfática é a mais importante variável patológica na predição de metástases no CP. Sua associação prognóstica foi primeiramente demonstrada por LOPES et al. (1996a) e posteriormente confirmada por vários autores como fator de risco independente para metástase linfonodal (SLATON et al.

2001; FICARRA et al. 2002; LOPES et al. 2002; CAMPOS et al. 2006). Poucos marcadores, porém, se associaram de forma significativa a esta característica. No presente estudo, houve perda intensa de ECAD no TFI nos casos com metástases ($p=0,0425$), assim como ganho de vimentina ($p=0,0001$). Podemos constatar na multivariada que a metástase linfonodal mostrou como fator independente para a perda intensa de ECAD e também é considerado fator prognóstico independente estimado para óbito pelo câncer pela análise multivariada.

Por esses achados, sugerimos que a EMT esteja associada com a agressividade e o processo de invasão e metastatização dos tumores penianos.

Tumores em estadios mais avançados (T2 e T3), tiveram perda intensa de ECAD no fronte ($p=0,2946$), porém, não observamos na região mais superficial do tumor. Já a perda de expressão no fronte foi significativa, na associação com o status dos linfonodos, os casos com metástase obterem 80% de perda intensa e apenas 5% de expressão semelhante ao normal.

A invasão perineural associou-se à perda de ECAD, tanto na região mais superficial do tumor ($p=0,0225$) quanto no fronte de invasão ($0,0284$).

Quanto à vimentina, mais da metade dos casos com invasão perineural mostraram ganho de expressão da proteína ($p=0,0246$). Um estudo do grupo mostrou que tumores bem diferenciados, sem invasão perineural, possuem um risco virtualmente inexistente para desenvolver metástases linfonodais. Contudo, se nesses mesmos pacientes com tumores grau 1 houver invasão perineural, o risco de metástases chega a quase 80%, indicando que essa característica é importante e pode ser útil como instrumento de avaliação de metástases regionais (VELAZQUEZ et al. 2008).

Na análise multivariada a invasão perineural foi considerada como fator prognóstico independente para óbito global em nosso estudo.

A invasão angiolinfática também mostrou a associação coerente com o proposto. A grande maioria dos casos com presença de embolização angiolinfática apresentou perda severa de ECAD no TFI ($p=0,0425$). Avaliando apenas o TPSC, não houve associação estatisticamente significativa ($p=0,8683$), reafirmando a importância da avaliação do TFI separadamente da massa tumoral. No caso da invasão perineural, a associação foi observada considerando os níveis de expressão no TPSC ($p=0,0225$), no TFI ($p=0,0284$). O estadió T também esteve associado. Estadió T1 apresentou significativamente menos casos com perda severa de expressão de ECAD do que os estádios T2 e T3 ($p=0,02946$) no TFI.

Uma análise importante revelada neste estudo é a técnica adotada para a preparação das lâminas. Nesse tipo de estudo é importante analisar lâminas em cortes convencionais, pois o TMA, que atualmente representa uma importante ferramenta para a pesquisa, por representar centenas de cortes de pacientes diferentes em uma mesma lâmina, uniformizando a reação de imuno-histoquímica e minimizando alguns artefatos relacionados especialmente com o tempo de exposição aos reagentes (ANDRADE et al. 2007), precisa ser considerado com cautela, especialmente na análise de marcadores que participem do processo de transição epitélio-mesênquima. Nesses casos, as áreas representadas na lâmina de TMA escolhidas por patologistas devem representar diferentes áreas do tumor, já que são sabidas essas diferenças de perfil protéico e de comportamento entre células no TFI e no TPSC.

Quanto à sobrevida, a expressão de ECAD na região superficial do tumor não apresentou associação significativa. Entretanto foi observado que os pacientes que

tiveram expressão normal de ECAD mostraram uma tendência de melhor sobrevida do que pacientes com perda do marcador, sobretudo na sobrevida câncer específica e livre de doença. Casos com perda discreta da expressão foram os que apresentaram pior sobrevida.

A avaliação desta molécula no TFI foi significativa para as três análises: sobrevida global ($p=0,0025$), câncer específica ($p=0,0005$) e livre de doença ($p=0,0001$).

A sobrevida câncer específica, em 10 anos, dos pacientes com expressão normal e perda discreta de ECAD ficou em aproximadamente 90%, enquanto nos casos com perda severa de expressão os pacientes vivos representaram apenas 60%. Na análise de sobrevida livre de doença (ou seja, avaliando recidiva), pacientes com expressão normal apresentaram 95% de sobrevida livre da doença; indivíduos com expressão discreta apresentaram 85%; e pacientes com perda severa da expressão tiveram aproximadamente 50%. Comparando com os achados do marcador no tumor, percebe-se que é a perda intensa de expressão de ECAD no TFI que mais se associa ao pior prognóstico, reafirmando a importância da EMT nos processos de invasão e metastatização. Outros estudos que avaliaram ECAD no CP não fizeram essa separação em áreas histológicas diferentes, e talvez isso explique por que não foram encontradas associações significativas em análises multivariadas (CAMPOS et al. 2006; ZHU et al. 2007). Entretanto, avaliando apenas o TPSC, a perda moderada de expressão parece ser indicativo de pior prognóstico do que a perda severa, o que não se explica na literatura, sendo então coerente com a progressão da EMT. Porém, quando esta perda ocorre no TFI (isto é, nas células que irão realizar a invasão) a severidade da perda parece acompanhar o prognóstico pior.

Além de estar associada com pior sobrevida livre de doença ($p=0,001$), a perda de expressão de ECAD no TFI associou-se também com a invasão angiolinfática e perineural indicando a importância desta proteína na avaliação da EMT. A análise multivariada revelou que a metástase linfonodal é fator prognóstico independente para a sobrevida câncer específica.

Achados semelhantes foram encontrados em outros tipos tumorais. Em tumores de cabeça e pescoço, a alta expressão de ECAD se associou a melhor sobrevida (MATTIJSEN et al. 1993). Em carcinoma de pulmão não pequenas células, a perda deste marcador associou-se com estadio avançado e óbito (LIN et al. 2010). Em carcinoma escamoso oral, a perda também esteve associada à recorrência e morte (LIU et al. 2009).

A menor expressão de vimentina se correlacionou com maior sobrevida global e câncer específica na análise univariada ($p<0,0001$). Em dez anos, casos negativos para a vimentina tinham a sobrevida câncer específica em torno de 95%, enquanto nos casos positivos para a vimentina, a sobrevida foi aproximadamente de 30%, e a análise multivariada mostrou que a expressão de vimentina é um fator independente para a sobrevida.

Em CP este marcador não havia sido previamente explorado, mas estes achados corroboram estudos com outros tumores epiteliais. Por exemplo, em CEC oral, LIU et al. (2010) demonstraram associação entre a positividade de vimentina e maior risco de óbito e de recorrência. Em CEC de esôfago, casos com ganho de expressão de vimentina apresentam risco aumentado para a presença de metástases nos linfonodos (JIN et al. 2010).

Esta diminuição altamente significativa sugere, mais uma vez, que o ganho de expressão de marcadores mesenquimais em células epiteliais deva estar associado a um fenótipo mais agressivo que capacita estas células a invadirem de forma mais eficiente os tecidos adjacentes, o que causa a formação de metástases, impactando de forma direta a sobrevida dos pacientes.

Dessa forma, demonstra-se que o fenômeno de transformação epitélio-mesênquima no fronte de invasão tumoral é um fator independente de mau prognóstico e recomenda-se a adoção desta análise na determinação do prognóstico do CP na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos nesse estudo, concluímos que o fenômeno de transição epitélio-mesênquima, neste trabalho representado pela perda da expressão de ECAD e ganho de expressão de vimentina no CP, tem as seguintes implicações:

- 1 A perda da expressão de e-caderina ocorre com maior frequência no fronte de invasão do tumor, quando comparado com as porções centrais e superficiais do tumor, devendo então ser avaliado nesta região;
- 2 A perda intensa da expressão de e-caderina está associada com os fatores clássicos de mau prognóstico, como tumores histologicamente pouco diferenciados, de padrão infiltrativo, com metástase linfonodal, invasão perineural, invasão angiolinfática e piores sobrevida câncer específica e global;
- 3 O fenótipo de transição epitélio-mesênquima definido como a perda da expressão de e-caderina e ganho de vimentina é associado com todos os fatores de mau prognóstico, incluindo piores sobrevidas global e câncer específica;
- 4 A expressão de vimentina no fronte de invasão tumoral tem relação com piores sobrevidas;
- 5 Os fatores prognósticos independentes, estimados para o óbito, pela doença, obtidos pelo modelo de regressão de Cox, foram o ganho de vimentina e a presença de metástase linfonodal;

- 6 Os fatores prognósticos independentes, estimados para sobrevida global obtidos pelo modelo de regressão de Cox, foram o ganho de expressão de vimentina, a presença de metástase linfonodal e a invasão perineural.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, et al. Epidermal growth factor stimulates epithelio-mesenchymal transition in the stable human breast carcinoma cell line variant PMC42-LA. **Lab Invest** 2003; 83:435-48.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Estrutura da membrana: organização interna da célula; p.583-614.

Andrade E, Andrade PM, Borra RC, Claro J, Srougi M. cDNA microarray analysis of differentially expressed genes in penile tissue after treatment with tadalafil. **BJU Int** 2008; 101:508-12.

Andrade JB. **Correlação clínico-patológica da expressão protéica do complexo CD44/ERM (Ezrina/Radixina/Moesina) no carcinoma de pênis**. São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Barros EM, Melo MCB. Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de Psicologia do Hospital do Câncer de Pernambuco. **Rev SBPH** 2009; 12: 53-68.

Basu D, Nguyen TT, Montone KT, et al. Evidence for mesenchymal-like subpopulations within squamous cell carcinomas possessing chemoresistance and phenotypic plasticity. **Oncogene** 2010; 29:4170-82.

Batlle E, Sancho E, Francí C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. **Nat Cell Biol** 2000; 2:84-9.

Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. **Eur J Cancer** 2000; 36:1607-20.

Bezerra ALR, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus DNA prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. **Am J Surg Pathol** 2001a; 25:673-8.

Bezerra ALR, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KCB, Latorre MRDO, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001b; 91:2315-21.

Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol** 2009; 27:141-50.

Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. **Biochem Pharmacol** 2000; 60:1091-9.

Brinton LA, Li JY, Rong SD, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Brumini R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-80**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1982.

Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. Ecadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. **Urology** 2006; 67:797-802.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. **Biochim Biophys Acta** 2001; 1552:39-45.

Cavallaro U, Schaffhauser B, Cristofori G. Cadherins and the tumor progression: is it all a swith? **Cancer Lett** 2002; 176:123-8.

Chaux A, Caballero C, Soares FA, et al. The prognostic index: a useful pathologic guide for prediction of nodal metastases and survival in penile squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2009a; 33:1049-57.

Chaux A, Reuter V, Lezcano C, Velazquez EF, Torres J, Cubilla AL. Comparison of morphologic features and outcome of resected recurrent and nonrecurrent squamous cell carcinoma of the penis: a study of 81 cases. **Am J Surg Pathol** 2009b; 33:1299-306.

Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res** 2006; 66:8319-26.

Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Riveros M. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis: a prospective study of 66 cases. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:753-63.

Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S, Young RH. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. **Int J Surg Pathol** 2001; 9:111-20.

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

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

Cunha IW, Guimaraes GC, Soares FA, et al. Pseudoglandular (adenoid, acantholytic) penile squamous cell carcinoma: a clinicopathologic and outcome study of 7 patients. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:551-5.

Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in situ and invasive disease. **Int J Cancer** 2005; 116:606-16.

Dean AL Jr. Epithelioma of the penis. **J Urol** 1935; 33:252-83.

Derrick FC Jr, Lynch KM Jr, Kretkowski RC, Yarbrough WJ. Epidermoid carcinoma of the penis: computer analysis of 87 cases. **J Urol** 1973; 110:303-5.

Derycke LD, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. **Int J Dev Biol** 2004; 48:463-76.

Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antunez-Lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2006; 42:190–200.

Droller MJ. Carcinoma of the penis: an overview. **Urol Clin North Am** 1980; 7:783-4.

Dutsch-Wicherek M. RCAS1, MT, and Vimentin as potencial markers of tumor microenvironment remodelling. **Am J Reprod Immunol** 2010; 63:181-8.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti. **AJCC cancer staging manual**. 7th. New York: Springer-Verlag; 2009. Penis; p.447-55.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **Pathology & genetics tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. Penile cancer; p.279-98. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 6).

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

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, et al. Predictive pathological factors of lymph node involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. **Int Urol Nephrol** 2002; 32:245-50.

Ficarra V, Zattoni F, Artibani W, et al. Nomogram predictive of pathological inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:1700-5.

Fraley EE, Zhang G, Manivel C, Niehans GA. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. **J Urol** 1989; 142:1478-82.

Frew ID, Jefferies JD, Swinney J. Carcinoma of the penis. **Br J Urol** 1976; 39:398-404.

Frisch M, Friis S, Kjaer SK, Melbye M. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population. **BMJ** 1995; 311:1471.

Gloeckler-Reis LA, Hankey BF, Edwards BK. **Cancer statistic review 1973-1987**. Bethesda: National Institute of Health; 1990. (National Institute of Health Publication, 90-2789).

Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 100:139-48.

Guidoni LRM. **Imunoexpressão e valor prognóstico de CD9 no carcinoma epidermóide de pênis**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Guimarães GC. **Estudos de fatores prognósticos e da expressão imunoistoquímica de PCNA e MIB-1 / KI-67 em pacientes portadores de CEC de pênis.** São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. **Urology** 2006; 68:148-53.

Guimarães GC, Leal ML, Campos RS, et al. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology** 2007; 70:137-42.

Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34; discussion 534.

Guimarães GC. **Análise de fatores prognósticos e da expressão imunoistoquímica da involucrina, e das proteínas da placa desmossômica: desmogleína, plakoglobina e desmoplakina através da técnica de "tissue microarray" em pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.** São Paulo, 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

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

Gursel EO, Georgountzos C, Uson AC, Melicow MM, Veenema RJ. Penile cancer: clinicopathology study of 64 cases. **Urology** 1973; 1:569-78.

Handschuh G, Candidus S, Luber B, et al. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. **Oncogene** 1999; 18:4301-12.

Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 34:255-68.

Harish K, Ravi R. The role of tobacco in penile carcinoma. **Br J Urol** 1995; 75:375-7.

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behavior? **Br Med J (Clin Res Ed)** 1987; 1295:1306-8.

Horenblas S, van Tinteren H, Delemarre JF, Moonen LM, Lustig V, van Waardenburg EW. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. **J Urol** 1993; 149:492-7.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. **Curr Opin Cell Biol** 2005; 17:548-58.

Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration and signaling. **Exp Cell Res** 2007; 313:2050-62.

Jin H, Morohashi S, Sato F, et al. Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. **Biomed Res** 2010; 31:105-12.

Johnson DE, Fuerst DE, Ayala AG. Carcinoma of the penis: experience in 153 cases. **Urology** 1973; 1:404-8.

Junqueira LC, Carneiro J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. Membrana plasmática: digestão intracelular; p.94-100.

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications to fibrosis. **J Clin Invest** 2003; 112:1776-84.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119:1420-8.

Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. **J Clin Invest** 2009; 119:1417-9.

Kleer CG, Giordano TJ, Braun T, Oberman HA. Pathologic, immunohistochemical, and molecular features of benign and malignant phyllodes tumors of the breast. **Mod Pathol** 2001; 14:185-90.

Leal MLO. **Estudo da expressão imuno-histoquímica de componentes da via wnt no carcinoma espeno-celular do pênis**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado- Universidade Federal de São Paulo]

Levi E, Rahal P, Sarkis AS, Villa LL. Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. **Int J Cancer** 1998; 76:779-83.

Lewis-Tuffin LJ, Rodriguez F, Giannini C, et al. Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. **PLoS One** 2010; 5:e13665.

Li M, Zhang B, Sun B, et al. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. **J Exp Clin Cancer Res** 2010; 29:109.

Lin Q, Li M, Shen ZY, et al. Prognostic impact of vascular endothelial growth factor-A and E-cadherin expression in completely resected pathologic stage I non-small cell lung cancer. **Jpn J Clin Oncol** 2010; 40:670-6.

Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. **Mod Pathol** 2010; 23:213-24.

Lodish H, Benk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. **Molecular cell biology**. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2000. Integrating cells into tissues; p.968-76.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Câncer de pênis. **Âmbito Hospitalar** 1994; 58:5-13.

Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. **J Urol** 1996a; 156:1637-42.

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

Lopes A, Bezerra AL, Serrano SV, Hidalgo GS. Iliac nodal metastases from carcinoma of the penis treated surgically. **BJU Int** 2000; 86:690-3.

Lopes A, Bezerra AL, Pinto CA, Serrano SV, de Mello CA, Villa LL. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **J Urol** 2002; 168:81-6.

McInroy L, Määttä A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 360:109-14.

Maddineni SB, Lau MM, Snagar VK. Identifying the needs of penile cancer sufferers: a systematic review of the quality of life, psychosexual and psychosocial literature in penile cancer. **BMC Urol** 2009; 9:8.

Maden C, Sherman KJ, Beckman AM, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:19-24.

Mandal M, Myers JN, Lippman SM, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. **Cancer** 2008; 112:2088-100.

Martins ACP, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci S Jr. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. **J Urol** 2002; 167:89-93.

Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. **Int J Cancer** 1993; 55:580-5.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. **Lancet Oncol** 2004; 5:240-7.

Moura JF **Correlação clínico-patológica da reatividade imunoistoquímica dos receptores acoplados a proteína G pela técnica de “tissue microarray” no CP/ São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].**

Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:355-66.

Narasimharao KL, Chatterjee H, Veliath AJ. Penile carcinoma in the first decade of life. **Br J Urol** 1985; 57:358.

Narayana AS, Olney LE, Loening SA, Weimar GW, Culp DA. Carcinoma of the penis: analysis of 219 cases. **Cancer** 1982; 49:2185-91.

Natsugoe S, Uchikado Y, Okumura H, et al. Snail plays a key role in E-cadherin-preserved esophageal squamous cell carcinoma. **Oncol Rep** 2007; 17:517-23.

Okubo T, Truong TK, Yu B, et al. Down-regulation of promoter 1.3 activity of the human aromatase gene in breast tissue by zinc-finger protein, snail (Snai1) **Cancer Res** 2001; 61:1338-46.

Parkin DM, Whelam SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. **Cancer incidence in five continents vol VII**. Lyon: IARC; 1997. (IARC Scientific Publications, 143).

Paymaster JC, Gangadharan P. Cancer of the penis in India. **J Urol** 1967; 97:110-3.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **Int J Dev Biol** 2004; 48:365-75.

Persky L, deKernion J. Carcinoma of the penis. **CA Cancer J Clin** 1986; 36:258-73.

Pompeo ACL, Koff W, Damião R, et al. **Carcinoma do pênis - Parte II**. Projeto Diretrizes – Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2006. p.1-9. Disponível em: <URL:http://www.projetodiretrizes.org.br/6_volume/13-CarcinomaPenisParteII.pdf>. [2011 março 12].

Puras A, Gonzales-Flores B, Rodrigues R. Treatment of carcinoma of the penis. **Proc Kimbrough Urol Semin** 1978; 12:143-52.

Radisky DC. Epithelial–mesenchymal transition. **J Cell Sci** 2005; 118:4325-6.

Raju GC, Naraynsingh V, Venu PS. Carcinoma of the penis in the West Indies: a Trinidad Study. **Trop Geogr Med** 1985; 37:334-6.

Rosemberg SK, Hennen G, Elfont E. Sexually transmitted papillomaviral infection in the male. VII. Is cancer of penis sexually transmitted? **Urology** 1991; 37:437-40.

Salvioni R, Necchi A, Piva L, Colecchia M, Nicolai N. Penile cancer. **Urol Oncol** 2009; 27:677-85.

Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. **J Urol** 1992; 147:389-92.

Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. **Cancer Res** 1991; 51, 6328-37.

Schock F, Perrimon N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. **Ann Rev Cell Dev Biol** 2002; 18:463-93.

Silva AMT. **Estudo da expressão protéica da família ErbB no carcinoma peniano**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. **J Urol** 2001; 165:1138-42.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM classificação de tumores malignos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Tumores urológicos: pênis; p.187-9.

Souza Neto AM. **Estudo da expressão imunoistoquímica da ciclina D1 em carcinoma espinocelular de pênis: correlação com variáveis clínicas e anatomopatológicas para identificação e avaliação de fatores prognósticos**. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU, Thiel E, Kreuser ED. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. **J Mol Med** (Berl) 1996; 74:253-68.

Strumane K, Berx G, Van Roy F. Cadherins in cancer. In: Behrens J, Nelson NW, editors. **Cell adhesion**. Berlin: Springer; 2004. p.69-103. (Handbook of experimental pharmacology, 165).

Sundfeldt K. Cell-cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule. **Mol Cell Endocrinol** 2003; 202:89-96.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:442-54.

Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome--components and functional correlates. **Genes Dev** 2006; 20:3215-31.

Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S, et al. Human Papillomavirus genotypes and HPV16 variantes en penile carcinoma. **Int J Cancer** 2008; 122:132-7.

Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a populationbased case-control study in Los Angeles County (United States). **Cancer Causes Control** 2001; 12:267–77.

van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M Defective E-CADherin/catenin complexes in human cancer. **Virchows Arch** 2001; 439:725–51.

Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, et al. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. **Hum Pathol** 1991; 22:908-13.

Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, et al. Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1995; 4:475-83.

Velazquez EF, Soares FA, Cunha IW, Lopes A, Barreto JE, Cubilla AL. Penile verruciform tumors: extended classification, differential diagnosis and outcome in 104 cases. **Lab Invest** 2007; 87:182A.

Velazquez EF, Ayala G, Liu H, 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 10mm. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:974-9.

Villa LL, Lopes A. Human Papillomavirus DNA sequence in penile carcinomas in Brazil. **Int J Cancer** 1986; 37:853-5.

Wheelock MJ, Soler AP, Knudsen KA. Cadherin junctions in mammary tumors. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2001; 6:275-85.

Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Ann Rev Cell Dev Biol** 2003; 19:207-35.

Wiener JS, Walther PJ. The association of oncogenic human papillomaviruses with urologic malignancy. **Surg Oncol Clin N Am** 1995; 4:257-76.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master Regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell** 2004; 117:927–39.

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Dev Cell** 2008; 14:818-29.

Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **J Clin Invest** 2009; 119:1429-37.

Zhou K, Wang G, Wang Y, Jin H, Yang S, Liu C. The potential involvement of E-cadherin and beta-catenins in meningioma. **PLoS One** 2010; 5:e11231.

Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, Dai B, Ye DW. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. **BJU Int** 2007; 100:204-8.

Anexo 1 - Classificação histológica OMS, 2004

I) Tumores malignos epiteliais de pênis

Carcinoma espinocelular

Carcinoma basalóide

Carcinoma condilomatoso

Carcinoma verrucoso

Carcinoma papilífero, não especificado de outra forma

Carcinoma sarcomatoso

Carcinoma misto

Carcinoma adenoescamoso

Carcinoma de células de Merkel

Carcinoma de pequenas células do tipo neuroendócrino

Carcinoma sebáceo

Carcinoma de células claras

Carcinoma de células basais

Acantolítico (CUNHA et al. 2009)

II) Lesões precursoras

Neoplasia intraepitelial grau III

Doença de Bowen

Eritroplasia de Queyrat

Doença de Paget

III) Tumores melanocíticos

Nevo melanocítico

Melanoma

IV) Tumores Mesenquimais

V) Tumores hematopoiéticos

VI) Tumores secundários

Fonte - Adaptado de EBLE et al. (2004)

Anexo 2 - Sistema de classificação do tumor de pênis – TNM, AJCC, 2010.

T – Tumor Primário
Tx – Tumor primário não avaliado
T0 – Sem evidência de tumor
Tis – Carcinoma <i>in situ</i>
Ta – Tumor verrucoso não invasivo
T1a – Tumor primário não avaliado
T0 – Sem evidência de tumor
Tis – Carcinoma <i>in situ</i>
T1a – Tumor invade tecido conectivo subepitelial sem invasão vascular e é bem diferenciado (ex.: tumores de grau 3 ou 4)
T1b – Tumor invade tecido conectivo subepitelial com invasão vascular ou é pouco diferenciado
T2 – Tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso
T3 – Tumor invade uretra ou próstata
T4 – Tumor invade estruturas adjacentes
N – Linfonodos Regionais
* Definição do Estadiamento Clínico – baseada em palpação e imagem
cNx – Linfonodos regionais não avaliados
cN0 – Sem linfonodos palpáveis ou visivelmente aumentados
cN1 – Linfonodo inguinal unilateral móvel e palpável
cN2 – Linfonodos inguinais bilaterais ou múltiplos móveis e palpáveis
cN3 – Massa nodal inguinal fixa e palpável ou linfadenopatia pélvica uni ou bilateral
* Definição do Estadiamento Patológico
pNx – Linfonodos regionais não avaliados
pN0 – Sem metástase nos linfonodos
pN1 – Metástase em um único linfonodo inguinal
pN2 – Metástase em linfonodos inguinais bilaterais ou múltiplos
pN3 – Extensão extranodal de metástases linfonodais ou de linfonodos pélvicos uni ou bilaterais
M – Metástases a Distância
M0 – Sem metástase a distância
M1 – Com metástase a distância

Fonte: SOBIN e WITTEKIND (2004); EDGE et al. (2009)