

**O PAPEL DOS RECEPTORES DE FATOR DE
CRESCIMENTO EPIDÉRMICO EGFR E HER2 E DA
TOPOISOMERASE II α NO CARCINOMA PENIANO**

ALICE MUGLIA THOMAZ DA SILVA AMÂNCIO

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares
Co-Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins**

**São Paulo
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Amâncio, Alice Muglia Thomaz da Silva

O papel dos receptores de fator de crescimento epidérmico EGFR e HER2 e da topoisomerase II α no carcinoma peniano / Alice Muglia Thomaz da Silva Amâncio – São Paulo, 2014.
99p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. NEOPLASIAS PENIANAS. 2. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO. 3. DNA TOPOISOMERASES TIPO II. 4. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 5. PROGNÓSTICO.

“A célula cancerosa é uma individualista desesperada,
em todos os sentidos imagináveis, uma inconformada. (...)
Vive desesperada, inventiva, feroz, territorial, astuciosa e defensivamente
– por vezes, como se *nos* ensinasse a sobreviver.
Enfrentar o câncer é encontrar uma espécie alternativa,
talvez mais adaptada à sobrevivência do que nós mesmos.”

Siddhartha Mukherjee, em O Imperador de Todos os Males.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Magda e Olinto, por terem sido a rocha para a
construção deste sonho.*

*Não há forma justa de retribuir tudo que vocês sempre me deram
– exemplo, apoio, incentivo, força e amor imensuráveis...*

*Ao meu amado irmão Henrique, por ser a razão para que eu
queira dar o melhor de mim a cada dia...*

*Ao meu marido Rondinele, por sempre encontrar o que existe de
melhor em mim, e nunca me deixar desistir...*

Vocês são minha razão de viver! É tudo por vocês!

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pelo dom da vida. Que a Sua luz seja sempre o meu guia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Soares, pelas palavras e pelo silêncio; pela cobrança e pela paciência; pelas palavras e ações. Sou grata pela oportunidade de ter aprendido tanto. Agradeço a formação profissional que me proporcionou e por todo meu crescimento ao longo desses anos;

À minha co-orientadora, Dra. Vilma Martins, pelo exemplo de dedicação. Agradeço imensamente as oportunidades de conversa e ter estado disponível e estimulado minhas buscas, meus sonhos;

Ao Departamento de Anatomia Patológica; em especial:

- o À Dra. Isabela Cunha, pelas análises da técnica de FISH e por todo suporte durante a realização deste trabalho;
- o Ao amigo (em breve, Dr!) José Ivanildo Neves, pelas tantas tentativas para fazer as reações de FISH finalmente funcionarem;
- o Ao Dr. José Vassallo, pelas conversas sobre os resultados deste estudo e pelo auxílio na elaboração dos manuscritos;
- o À Dra. Sílvia Lourenço, pela confiança no meu trabalho e incentivo às minhas futuras buscas;
- o À amiga Liliane Cilento pelo sorriso e amizade de sempre;

Ao Departamento de Cirurgia Pélvica; em especial:

- o A Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, pelo auxílio com os dados clínicos e por conseguir, mesmo em pouco tempo entre as consultas, me fazer entender um pouco dessa doença;
- o À enfermeira de pesquisa Thais Giuliangelis, pela presteza e gentileza nos (muitos) momentos que me auxiliou com dados de pacientes;
- o A Dr. Walter da Costa, pela ajuda com as análises multivariadas;

Ao Departamento de Patologia Investigativa no Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE); em especial:

- o Às amigas do grupo de câncer de pênis, Adriana Bulgarelli, Elisângela Silva e Juliana Bartholo, pela amizade e pelo apoio nas conversas, e pelo auxílio com os artigos e com as técnicas;
- o À amiga Marcilei Buim, por todo o carinho, companheirismo, apoio e amizade. Aprendi muito com você!
- o Aos demais amigos de departamento; em especial a André Lavorato, Bianca Troncarelli, Cláudia Coutinho, Elen Alves, Fernanda Carvalho, Gabriela Madureira, Juliano Jampietro, Katia Klug, Lígia Petrolini, Michelle Barcelos, Natalie Kelner, Renata Iañez e Yukie Kuwabara, por todos os momentos de amizade e aprendizado;

Aos demais amigos do CIPE; especialmente a Cleiton Machado, Bruna Roz, Tatiana Ricca e Maria Galli, pela ajuda na bancada;

Às colegas do escritório de projetos, em nome de Gilmara Silva, Kelly Brito e Carla Pereira, por todos os esclarecimentos e auxílio durante o projeto;

Aos professores membros da banca de qualificação, Dr. Alex Fiorini de Carvalho e Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio por todas as considerações e comentários que guiaram a finalização deste trabalho;

A toda equipe da biblioteca; em especial, à Suely Francisco, pela atenção durante as pesquisas bibliográficas e pela formatação deste trabalho;

Aos funcionários da pós-graduação Ana Kuninari, Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Reinaldo Carolino, pela paciência e disponibilidade com que sempre me receberam e auxiliaram;

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro à esta pesquisa;

RESUMO

Silva-Amancio AMT. **O papel dos receptores de fator de crescimento epidérmico EGFR e HER2 e da topoisomerase II α no carcinoma peniano.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma peniano (CP) é frequente em países em desenvolvimento e, na presença de metástases nos linfonodos, as opções terapêuticas são restritas. Os receptores de fator de crescimento epidérmico HER1 (ou EGFR) e HER2 são superexpressos em muitas neoplasias e alvos para terapias. EGFR é amplamente expresso em CP e parece haver benefício clínico para pacientes com o uso de terapia anti-EGFR. A expressão de HER2, que atua em pares com EGFR, não é reportada em CP; mas dados anteriores de nosso grupo mostram associação com sobrevida reduzida. Marcadores de proliferação celular, como Ki-67, são controversos. Topoisomerase II α (TOP2a) é um marcador proliferativo geralmente co-amplificado com HER2. O presente estudo objetivou avaliar: (a) expressão de formas mutadas de EGFR (mutação L858R, no éxon 21; e deleção E746-A750, no éxon 19) em 135 casos de CP emblocados em parafina, através de imuno-histoquímica (IHQ); (b) presença de mutações nos quatro éxons codificadores do domínio tirosina-cinase de EGFR (18, 19, 20 e 21) em 29 casos congelados através de sequenciamento; (c) alterações no número de cópias gênicas de *EGFR*, *HER2* e *TOP2a* através de FISH em 70 casos; (d) expressão de topoisomerase II α (TOP2a) nos 135 casos, através de IHQ e, por fim, (e) associar os achados com variáveis clínicas, patológicas e sobrevida. **Resultados:** Os casos de CP avaliados foram negativos para as mutações estudadas por IHQ (nos éxons 19 e 21) e por sequenciamento (éxons 18 a 21). Quanto à análise de *EGFR* por FISH, a maioria dos casos (79,3%) apresentou dissomia, 16 casos (23,5%) apresentaram polissomia do cromossomo 7 e seis casos (8,9%) ganhos de *EGFR*. Casos aumento do número de cópias de *EGFR* (anc*EGFR*), seja por

polissomia ou ganhos do gene, se associaram a mais alto grau ($p=0,014$) e menor taxa de sobrevida global ($p=0,046$) e câncer-específica ($p=0,005$). Quanto a HER2 e TOP2a, essa série não apresentou amplificação dos genes avaliados, e apresentou polissomia do cromossomo 17 (p17) em 22,6% dos 53 casos avaliáveis. Esses casos apresentaram maior associação com recidivas ($p<0,001$), com infiltração de uretra ($p=0,022$) e com sobrevida global, câncer-específica e sobrevida livre de recidivas reduzidas, comparado com pacientes sem alteração ($p=0,026$, $p=0,001$ e $p<0,001$, respectivamente), mas sem associação com *ancEGFR* ($p=0,068$). A expressão de TOP2a foi nuclear e heterogênea, sendo 29,4% da amostra (25 dos 85 casos avaliáveis) positiva em mais de 30% das células. Houve associação com invasão vasculo-linfática ($p=0,024$), mas não com sobrevida. **Conclusões:** Aumento do número de cópias de *EGFR* e P17 parece ter impacto significativo no prognóstico de pacientes portadores de carcinoma peniano, fazendo desses pacientes possíveis potenciais beneficiários de terapias cujos alvos sejam esses marcadores. Apesar da ausência de mutações nos éxons de *EGFR* estudados, outras alterações podem justificar a frequente expressão deste marcador nestes tumores. O marcador proliferativo TOP2a, na presente série, não mostrou associação prognóstica significativa.

SUMMARY

Silva-Amancio AMT. **[The role of epidermal growth factor receptors EGFR and HER2 and of topoisomerase II α in penile cancer]**. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Penile cancer (PC) is frequent in developing countries and therapeutics options are restricted in advanced disease. Epidermal growth factor receptors HER1 (also known as EGFR) and HER2 are overexpressed in diverse neoplasms and are targets for therapies. EGFR is widely expressed in PC, and there seems to be clinical benefit for patients with the use of EGFR-targeted therapies, even though the role of this marker in disease progression or in the patients' selection is still unknown. HER2, which dimerizes with EGFR, is not reported in PC; however, unpublished data from our group show association with cytoplasmic expression and reduced survival rates. Proliferative index markers such as Ki-67 are controversial in PC. Topoisomerase II α (TOP2a) is a proliferative marker that is generally co-amplified with HER2. This study has aimed at evaluating (a) the expression of two mutated forms of EGFR (point mutation L858R in exon 21, and deletion E746-A750 in exon 19) in 135 formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) samples of PC using immunohistochemistry (IHC); (b) presence of mutations in the four exons that encode EGFR tyrosine kinase (TK) domain (exons 18 to 21) in 29 frozen samples of PC using Sanger sequencing; (c) alteration in the number of copied of genes *EGFR*, *HER2* and *TOP2a* in 70 FFPE samples using fluoresce *in situ* hybridization (FISH); (d) TOP2a expression in the 135 FFPE samples using IHC; and associate these findings with clinical, pathological and survival data of patients.

Results: All evaluated cases of PC were negative for the studies mutations using both IHC (two mutations in exons 19 and 21) and sequencing (exons 18 to 21). Exon 20 presented a single nucleotide polymorphism (p.Q787Q) without clinical significance (19/29 sequenced cases). Regarding *EGFR*

using FISH, most cases (79.3%) presented disomy, 16 (23.5%) presented polysomy of chromosome 7 and six cases (8.9%) presented EGFR gains. Cases with increased *EGFR* gene copy number (due to chromosome 7 polysomy or gene gains) were associated with higher histological grade ($p=0.014$), and reduced global ($p=0.046$) and cancer-specific survival ($p=0.005$). Amplifications of HER2 and TOP2a were not observed in this series, and polysomy of chromosome 17 (P17) represented 14.6% of cases. Patients with P17 had higher recurrence rates ($p<0.001$), more urethra infiltration ($p=0.022$), and reduced global, cancer-specific and disease free survival ($p=0.029$, $p=0.001$ and $p<0.001$, respectively), without associations with increased *EGFR* copies ($p=0.068$). TOP2a expression was heterogeneous and 29.4% of sample presented more than 30% of positive nucleus, which associated with vascular invasion ($p=0.024$). There were not associations with survival rates. **Conclusions:** increased *EGFR* gene copies and P17 seem to have a significant impact on patients' prognosis and, because of that, PC patients may potentially benefit from EGFR- and HER2-targeted therapies. Although mutations in the exons encoding TK domain of EGFR were not found, other alterations might be found and explain the high frequency of this marker in PC. Proliferative index marker TOP2a did not have a prognostic association in the present series.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição anual das publicações sobre câncer de pênis na base de dados Medline buscadas a partir do descritor <i>penile cancer</i> em outubro de 2014.....	8
Figura 2	Esquema da conformação dos dímeros e ativação cruzada dos receptores de fatores de crescimento epidérmico na membrana celular.....	13
Figura 3	Marcação citoplasmática de HER2 em amostra de carcinoma de pênis.....	18
Figura 4	Abordagens do uso de EGFR como alvo de terapia.....	21
Figura 5	Marcação positiva do anticorpo que reconhece a mutação L858R no éxon 21 em amostra de adenocarcinoma de pulmão.....	37
Figura 6	Imagens de caso de carcinoma de pênis negativo para a mutação L858R.....	38
Figura 7	Marcação positiva do anticorpo que reconhece a deleção A746-E750 no éxon 19 em caso de adenocarcinoma de pulmão.....	39
Figura 8	Imagens com exemplos dos casos de carcinoma de pênis negativos para a deleção A746-E750.....	40
Figura 9	Categorias observadas nas análises de FISH com sonda dupla para o gene <i>EGFR</i> e o centrômero do cromossomo 7....	42

Figura 10	Sobrevida câncer-específica dos pacientes de acordo com as categorias de alterações vistas pela técnica de FISH para o gene <i>EGFR</i>	43
Figura 11	Categorias observadas nas análises de FISH com sonda tripla para <i>HER2</i> , <i>TOP2a</i> e centrômero do cromossomo 17 demonstrando um exemplo de dissomia.....	44
Figura 12	Categorias observadas nas análises de FISH com sonda dupla para o gene <i>HER2</i> e o centrômero do cromossomo 17.....	45
Figura 13	Imagens da marcação heterogênea de <i>TOP2a</i> em amostras de carcinoma peniano.....	46
Figura 14	Imagens dos casos de carcinoma peniano avaliados quanto à expressão <i>TOP2a</i>	47
Figura 15	Distribuição dos casos de carcinoma peniano com P17 apresentando dissomia do cromossomo 7 , polissomia do cromossomo 7 ou amplificação de <i>EGFR</i>	52
Figura 16	Sobrevida global de pacientes com carcinoma peniano avaliados na presente série.....	57
Figura 17	Sobrevida câncer-específica de pacientes com carcinoma peniano avaliados na presente série.....	60
Figura 18	Sobrevida livre de recidiva de pacientes com carcinoma peniano avaliados na presente série.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano avaliados no presente estudo.....	29
Tabela 2	Anticorpos utilizados para a análise da expressão de duas isoformas mutadas de EGFR (mL858R e delA746-E759) e de TOP2a.....	31
Tabela 3	Sondas utilizadas para a análise de número de cópias gênicas de <i>EGFR</i> , <i>HER2</i> e <i>TOP2a</i>	35
Tabela 4	Associação entre número de cópias gênicas de <i>EGFR</i> por FISH e dados clínicos e patológicos dos casos de carcinoma peniano.....	49
Tabela 5	Associação entre polissomia do cromossomo 17 por FISH e dados clínicos e patológicos dos casos de carcinoma peniano.....	51
Tabela 6	Associação entre a expressão de TOP2a por IHQ e dados clínicos e patológicos dos casos de carcinoma peniano.....	53
Tabela 7	Associação entre presença de metástases nos linfonodos e dados clínicos e patológicos dos casos de carcinoma peniano.....	55
Tabela 8	Associação entre a presença de metástases nos linfonodos e variáveis moleculares nos casos de carcinoma peniano.....	56

Tabela 9	Associação entre sobrevida global e variáveis clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano.....	58
Tabela 10	Associação entre sobrevida global e variáveis moleculares dos pacientes portadores carcinomas penianos.....	60
Tabela 11	Associação entre sobrevida câncer-específica e variáveis clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano.....	61
Tabela 12	Associação entre sobrevida câncer-específica e variáveis moleculares dos pacientes portadores de carcinoma peniano.....	62
Tabela 13	Associação entre sobrevida livre de recidiva e variáveis clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano.....	64
Tabela 14	Associação entre sobrevida livre de recidiva e variáveis moleculares dos pacientes portadores de carcinoma peniano.....	65
Tabela 15	Variáveis associadas com presença de metástases em linfonodos na análise univariada com valor de $p < 0,020$	66
Tabela 16	Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase nos linfonodos em pacientes portadores de carcinoma peniano.....	66

Tabela 17	Variáveis associadas com sobrevida global na análise univariada com valor de $p < 0,020$	67
Tabela 18	Variáveis independentes associadas com a sobrevida global de pacientes portadores de carcinoma peniano.....	67
Tabela 19	Variáveis associadas com sobrevida câncer-específica na análise univariada com valor de $p < 0,020$	68
Tabela 20	Variável independente associada a sobrevida câncer-específica de pacientes portadores de carcinoma peniano..	68
Tabela 21	Análise multivariada da associação entre <i>ancEGFR</i> e sobrevida câncer-específica de pacientes portadores de carcinoma peniano.....	68
Tabela 22	Variáveis associadas com sobrevida livre de recidiva na análise univariada com valor de $p < 0,020$	69
Tabela 23	Variável independente associada com a sobrevida livre de recidiva de pacientes portadores de carcinoma peniano.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	<i>Protein kinase B (PKB)</i>
ancEGFR	Aumento do número de cópias de <i>EGFR</i>
BD	Braço de dimerização
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEP17	Centrômero do Cromossomo 17
CP	Câncer peniano
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Edipérmico (Epidermal Growth Factor Receptor)
ERBB	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente
HCl	Ácido Clorídrico
HER1	<i>Human Epidermal growth factor Receptor</i> tipo 1
HER	<i>Human Epidermal growth factor Receptor</i> tipo 2
HPV	Papillomavirus Humano
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IHQ	Imuno-histoquímica
kDa	Quilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LN	Linfonodos
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAb	Anticorpo Monoclonal (Monoclonal Antibody)
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NIH	<i>National Health Institute</i>

P17	Polissomia do cromossomo 17
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3k	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
RARA	<i>Retinoic Acid Receptor α</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
SCC	Carcinoma de Células Escamosas (Squamous Cell Carcinoma)
SCE	Sobrevida Câncer-Específica
SLR	Sobrevida Livre de Recidiva
SMS	<i>Spermine synthase</i>
SNP	Polimorfismo de base única (Single Nucleotide Polymorphism)
SSC	<i>Saline Sodium Citrate Stringent wash buffer</i>
TK	Tirosina-Cinase
TMA	Microarranjo de Tecido (Tissue Microarray)
TNM	<i>Tumor Nodes Metastasis</i>
TOP2a	Topoisomerase II α
TP53	Proteína Tumoral p53 (Tumor Protein p53)
VMB	<i>Vincristine-Methotrexate-Bleomycin</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma Peniano	1
1.1.1	Epidemiologia e etiologia do Carcinoma Peniano	1
1.1.2	Aspectos clínicos e de Tratamento do Carcinoma Peniano	3
1.1.3	Aspectos Patológicos do Carcinoma Peniano	5
1.1.4	Aspectos Moleculares no Carcinoma Peniano	7
1.2	Receptores de Fatores de Crescimento Epidérmico: a Família ERBB.....	11
1.2.1	HER1, ou EGFR	13
1.2.2	HER2 (ou ErbB2).....	17
1.2.3	Terapia alvo de EGFR e HER2	20
1.3	Topoisomerase IIA (TOP2A)	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Seleção dos pacientes	28
3.2	Imuno-histoquímica (IHQ).....	31
3.2.1	IHQ automatizada para formas mutadas de EGFR	32
3.2.2	IHQ convencional manual para TOP2a	32
3.3	Sequenciamento.....	34
3.4	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	34
3.5	Forma de análise dos resultados.....	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Expressão imuno-histoquímica de formas mutadas de EGFR	37
4.1.1	Mutação L858R	37
4.1.2	Deleção A746-E750	38
4.2	Sequenciamento dos éxons 18, 19, 20 e 21 de <i>EGFR</i>	41
4.3	Análise de número de cópias gênicas pela técnica de hibridação <i>in</i>	

<i>situ</i> fluorescente (FISH)	41
4.3.1 Análise de número de cópias gênicas de <i>EGFR</i>	41
4.3.2 Análise de número de cópias gênicas de <i>HER2</i> e <i>TOP2a</i>	43
4.4 Expressão imuno-histoquímica da Topoisomerase II α	46
4.5 Associação das variáveis moleculares com variáveis clínicas e patológicas	48
4.5.1 Aumento do número de cópias de <i>EGFR</i> (<i>ancEGFR</i>) e variáveis clínicas e patológicas	48
4.5.2 Polissomia do Cromossomo 17 e variáveis clínicas e patológicas	50
4.5.3 Expressão de TOP2a e a variáveis clínicas e patológicas	52
4.6 Avaliação do comprometimento dos linfonodos (LN)	54
4.6.1 Comprometimento de LN e variáveis clínicas e patológicas.....	54
4.6.2 Comprometimento de LN e variáveis moleculares	56
4.7 Análises de Sobrevida	56
4.7.1 Sobrevida global.....	56
4.7.2 Sobrevida câncer-específica	59
4.7.3 Sobrevida Livre de Recidiva	62
4.8 Análises Multivariadas	65
4.8.1 Análise multivariada do comprometimento de linfonodos.....	65
4.8.2 Análise multivariada de sobrevida global	66
4.8.3 Análise multivariada de sobrevida câncer-específica	67
4.8.4 Análise multivariada de sobrevida livre de recidiva	79
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ANEXOS

- Anexo 1** Resultados anteriores obtidos durante a análise da expressão de EGFR no carcinoma peniano
- Anexo 2** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 3** Artigo publicado com parte dos resultados desta tese.

- Anexo 4** Gráficos Kaplan-Meyer com curvas de sobrevida global das variáveis clínicas, patológicas e moleculares dos tumores penianos avaliados neste estudo.
- Anexo 5** Gráficos Kaplan-Meyer com curvas de sobrevida câncer-específica das variáveis clínicas, patológicas e moleculares dos tumores penianos avaliados.
- Anexo 6** Gráficos Kaplan-Meyer com curvas de sobrevida livre de recidiva das variáveis clínicas, patológicas e moleculares dos tumores penianos avaliados.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA PENIANO

1.1.1 Epidemiologia e Etiologia do Carcinoma Peniano

O carcinoma peniano (CP) é raro em nações desenvolvidas; porém, as comum em países em desenvolvimento. As regiões com maior incidência são aquelas com baixo desenvolvimento socioeconômico, especialmente em países da América do Sul, África e Ásia (MISRA et al. 2004; SALVIONI et al. 2009; CHAUX e CUBILLA 2012a).

Tipicamente, o CP se apresenta entre a sexta e a sétima década de vida, mas também há relatos em pacientes mais jovens (SONPAVDE et al. 2013; SPIESS et al. 2013). O diagnóstico é, em geral, tardio, limitando as possibilidades terapêuticas (CHAUX e CUBILLA 2012a; SONPAVDE et al. 2013; BARSKI et al. 2014).

No Brasil, um estudo epidemiológico promovido pela Sociedade Brasileira de Urologia entre maio de 2006 e junho de 2007 demonstrou que as regiões Norte e Nordeste registraram até 6,8 casos/100.000 habitantes, e nelas estavam concentradas 53,02% dos casos no país. Nestas regiões, casos de câncer de pênis superaram os de próstata e bexiga, e isto confere grande importância para o seu estudo. Apenas no estado do Maranhão, um estado pouco populoso e com baixo índice de desenvolvimento humano

(IDH), concentraram-se 22,7% dos casos. Os casos na região sul representaram menos de 1% dos casos no país (FAVORITO et al. 2008).

Mais recentemente, um estudo realizado em hospitais públicos da cidade do Rio de Janeiro observou que quase 80% dos 230 pacientes avaliados foram diagnosticados em estádios clínicos avançados, T2 e T3; isto é, casos que apresentam invasão de corpora cavernosa e esponjosa e invasão de uretra, respectivamente, de acordo com a classificação do *American Joint Committee on Cancer-AJCC* (EDGE et al. 2010; KOIFMAN et al. 2011).

Dentre os principais fatores de risco para esta neoplasia estão falta de higiene, presença de fimose, histórico de doenças venéreas, infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e uso de tabaco. Inflamação, feridas ou ulcerações no pênis são condições frequentemente associadas ao aparecimento e evolução da doença (BEZERRA et al. 2001; LOPES et al. 2002; DALING et al. 2005; LONT et al. 2006a; BLEEKER et al. 2009). A circuncisão neonatal é altamente protetora para o desenvolvimento de CP, e políticas públicas neste sentido são necessárias. (SCHOEN et al. 2000). Promiscuidade e zoofilia podem estar associadas ao desenvolvimento da doença, sendo a infecção por agentes biológicos adquiridos pelo hábito da zoofilia possíveis agentes causais (ZEQUI et al. 2012).

A infecção pelo HPV ocorre entre 25% a 40% dos casos de CP (com relatos de até 70%, de acordo com o método de detecção empregado ou com a região geográfica). Os tipos 16 e 18 são os mais frequentes em casos invasivos. A infecção está associada a subtipos histológicos específicos

(KRUSTRUP et al. 2009), e seu papel no prognóstico dos pacientes ainda é controverso (LONT et al. 2006b; SPIESS et al. 2013; DJAJADININGRAT et al. 2014; HERNANDEZ et al. 2014).

1.1.2 Aspectos clínicos e de Tratamento do Carcinoma Peniano

A principal via de disseminação do CP é a linfática, apresentando metástases regionais, preferencialmente para os linfonodos (LN) inguinais e, depois, para os ilíacos. Metástases nos linfonodos desta região são, portanto, a via de disseminação precoce no CP e constituem o principal fator prognóstico da doença. É uma doença localmente agressiva; metástases por via hematológica são raras (LOPES et al. 1996; FICARRA et al. 2010).

A avaliação clínica do comprometimento dos LN é complexa, uma vez que o aumento pode ocorrer por outras causas além da presença de nódulo metastático (por exemplo, reações inflamatórias do tumor e infecciosas secundárias na lesão peniana). Pacientes com metástases nos LN (estádio clínico N1, N2 e N3) são candidatos à linfadenectomia, procedimento com muitas comorbidades associadas, como infecção, necrose, linfedema e até óbito (HORENBLAS 2001; FICARRA et al. 2009). Até 50% dos pacientes com LN positivos no exame clínico são, na verdade, negativos no exame patológico (HORENBLAS 2001; KOIFMAN et al. 2011). Por esta razão, outras formas de seleção destes pacientes são necessárias, a fim de se evitar procedimentos mórbitos desnecessários.

Há nomogramas que tentam estimar este risco e de selecionar com maior critério os pacientes que realmente se beneficiariam, apesar da

morbimortalidade inerente ao procedimento. Estes nomogramas baseiam-se em estadiamento clínico dos linfonodos inguinais e achados patológicos dos tumores primários, mas apresentam falhas na seleção (FICARRA et al. 2006; VELAZQUEZ et al. 2008).

Atualmente, sugere-se que uma reavaliação do estágio clínico N seja realizada após 4 a 6 semanas da remoção da lesão primária, com uso de antibióticos durante este período, a fim de reduzir as taxas de falsos positivos (HEYNS et al. 2010; GUIMARÃES et al. 2011).

O tratamento do carcinoma peniano é essencialmente cirúrgico. Algumas lesões pequenas em estádios iniciais podem ser tratadas com biópsias excisionais, uso de laser ou radioterapia apenas. Em casos avançados, a amputação parcial ou total ainda é necessária, e a confirmação histológica é essencial para o planejamento do tratamento. Quimioterapia neoadjuvante pode ser usada em algumas situações; em especial, para melhorar a ressecabilidade (ANTUNES et al. 2007; PETTAWAY et al. 2010; GUIMARÃES et al. 2011).

As taxas de resposta à quimioterapia convencional são baixas, apesar dos diferentes protocolos adotados em diferentes centros pelo mundo. As melhores respostas são encontradas com vincristina, metotrexato e bleomicina (VMB) ou regimes baseados em cisplatina; porém ambos apresentam alta toxicidade (GUIMARÃES et al. 2011; BARSKI et al. 2014). Nesse sentido, especialmente para casos avançados, novas terapias com alvos moleculares, como o receptor de fator de crescimento epidérmico

(EGFR) têm surgido como uma opção terapêutica importante (MINHAS 2014).

1.1.3 Aspectos Patológicos do Carcinoma Peniano

De forma geral, estes tumores iniciam-se como uma lesão na glândula ou prepúcio e, se não for tratada em estágios iniciais, evolui infiltrando tecidos adjacentes como corpo esponjoso, corpo cavernoso e uretra (CUBILLA 2009).

A embolização vascular (linfática e/ou venosa) foi a primeira variável patológica descrita como fator prognóstico independente para o câncer peniano por sua associação à metástase nos linfonodos (LOPES et al. 1996), posteriormente confirmado em outros trabalhos (SLATON et al. 2001; FICARRA et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2006). A profundidade de invasão tumoral no tecido adjacente também foi associada a este evento (LOPES et al. 1996), assim como estadiamento clínico N (CAMPOS et al. 2006).

Subtipos histológicos também têm um papel no prognóstico. A maioria dos casos é carcinoma de células escamosas (SCC; do inglês, *squamous cell carcinoma*), sendo que cerca de 50% dos casos apresenta histologia típica (ou subtipo usual). Os subtipos condilomatoso, verrucoso e papilar apresentam crescimento exofítico, microscopicamente papilomatosos e bem diferenciados, de bom prognóstico, e esse grupo corresponde a, aproximadamente, 15% a 30% dos casos. São associados a HPV de baixo risco e não invasores, sem acantólise ou coilocitose. Dentre os subtipos de mau prognóstico estão os basaloides (até 10% dos casos), que

frequentemente são lesões ulceradas, com invasão vascular e linfática e metástases; e os sarcomatoides (menos de 5% dos casos), que são lesões polipoides altamente hemorrágicas e necróticas. Há subtipos mais raros como o pseudoglandular, que apresenta extensa acantólise e necrose no centro dos nichos tumorais (CUNHA et al. 2009); adenoescamoso, que são tumores mistos caracterizados por grandes nichos escamosos e áreas de diferenciação glandular; e *cuniculatum*, variante verruciforme caracterizado por um padrão de crescimento semelhante a labirintos. Subtipos mistos, como Warty-basaloide, com morfologia heterogênea, aproximadamente 10% dos casos e prognóstico intermediário. (GUIMARÃES et al. 2009; CHAUX et al. 2010a e b; CHAUX e CUBILLA 2012a). É essencial o reconhecimento dessas entidades através do treinamento adequado de patologistas para que o paciente seja estadiado adequadamente. Há casos de sub-estadiamento da doença pela não identificação acurada de características patológicas dos tumores (CORBISHLEY 2014).

O grau de diferenciação é um aspecto descrito por muitos autores como preditivo de comprometimento dos linfonodos e de sobrevida. Tumores pouco diferenciados apresentam maior risco de desenvolvimento de metástases (SLATON et al. 2001; FICARRA et al. 2002; CUNHA et al. 2009). Recentemente, o grau de diferenciação histológica foi incorporado ao sistema TNM de classificação de neoplasias penianas, juntamente com a condição dos linfonodos. Classificam-se pacientes T1a aqueles sem evidência de doença linfática e com tumores moderadamente a bem diferenciados (ou seja, de baixo grau) e T1B pacientes cuja doença atingiu

vasos linfáticos ou que sejam tumores pouco diferenciados ou indiferenciados (alto grau) (SOBIN e COMPTON 2010).

A presença de células tumorais invadindo o espaço perineural é outra característica importante, incluída inclusive em nomogramas que tentam estimar o risco aumentado de comprometimento de LN. Essa associação é particularmente valiosa devido a sua distinta característica morfológica, o que facilita sua identificação (VELAZQUEZ et al. 2008; CUBILLA 2009; GUIMARÃES et al. 2009; CHAUX e CUBILLA 2012b).

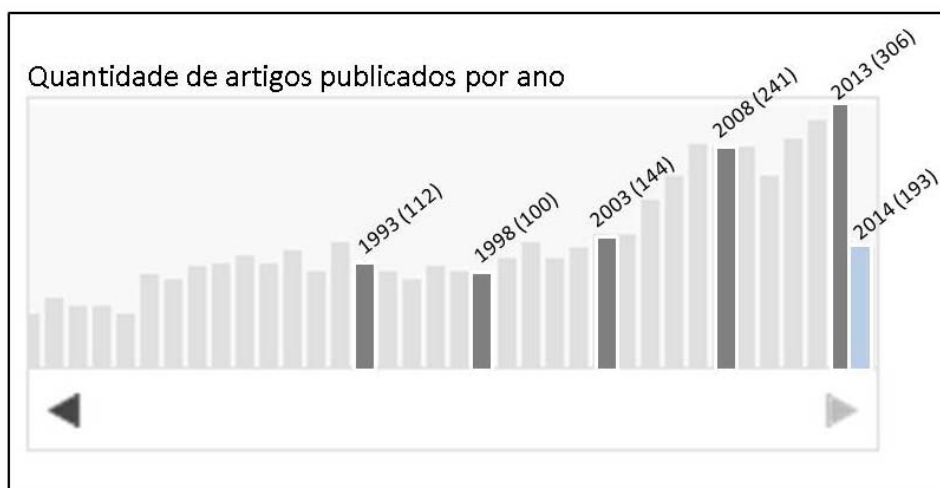
O padrão de crescimento e invasão tumoral (exofítico ou infiltrativo) foi correlacionado ao comprometimento de linfonodos, sendo observado maior comprometimento em casos com padrão infiltrativo, caracterizado pela invasão de pequenos grupos de células; quando comprado ao padrão exofítico de crescimento, onde se observa o tumor “empurrando” o tecido adjacente, sem invasão em pequenos grupos (GUIMARÃES et al. 2006).

Todavia, a presença de metástases nos LN no exame patológico (estádio N1) ainda constitui o principal fator prognóstico, e por isto a linfadenectomia ainda é um procedimento necessário no controle de doença avançada (RIEKEN et al. 2014).

1.1.4 Aspectos Moleculares no Carcinoma Peniano

Aspectos moleculares ainda são pouco explorados. Porém, nos últimos 10 anos, especialmente, o interesse por esta neoplasia típica de países em desenvolvimento tem crescido. Uma busca na base de dados *Medline* em outubro de 2014 encontrou 6150 e 3982 publicações quando

buscados os descritores *penile cancer* e *penile carcinoma*, respectivamente. O gráfico gerado pela base de dados a partir de busca do primeiro descritor mostra esta tendência de crescimento (Figura 1).



Fonte: Adaptado da base de dados Medline, disponível em www.pubmed.com, acessado em 16/10/2014.

Figura 1 - Distribuição anual das publicações sobre câncer de pênis na base de dados Medline buscadas a partir do descritor *penile cancer* em outubro de 2014.

A maioria dos estudos apresenta aspectos clínicos da doença. Estudos sobre características moleculares são minoria, sendo que a casuística reduzida dos estudos compromete as conclusões, interferindo na relevância dos achados. É necessário o empenho de países com alta incidência na busca de novos fatores prognósticos que esclareçam a biologia do tumoral e abram novas opções de conduta e tratamento aos pacientes.

O primeiro estudo de um marcador molecular no CP foi realizado por nosso grupo e avaliou sua relação com o supressor tumoral p53. Foi

mostrado que a positividade de p53 (ou seja, perda de sua função biológica) é fator independente de risco para metástase no linfonodo e morte. Os autores observaram ainda associação entre a positividade para p53 na presença de DNA de HPV com pior prognóstico (LOPES et al. 2002). Outros estudos demonstraram também que a superexpressão de p53 está associada à baixa diferenciação, disseminação linfática, recorrência e sobrevida câncer-específica (MARTINS et al. 2002; ZHU et al. 2007; ROCHA et al. 2012; FERRANDIZ-PULIDO et al. 2013).

Dentre os marcadores de proliferação, a expressão de Ki-67 tem papel contraditório. Enquanto alguns estudos mostram associação significativa da expressão do marcador com prognóstico e risco de metástases no LN (PROTZEL et al. 2007; ZHU et al. 2007), outros (BERDJIS et al. 2005; BERNEY et al. 2008; STANKIEWICZ et al. 2012), incluindo estudo realizado por nosso grupo (GUIMARÃES et al. 2007), não observam a mesma associação. Outros marcadores proliferativos devem então ser buscados. Um exemplo é a topoisomerase II α (TOP2a), que controla o enovelamento do DNA durante a transcrição e replicação. Sua expressão foi avaliada no CP e foi mais frequente em tumores com alta taxa de proliferação medida por Ki-67, mais alta em subtipos basaloide e mais baixa em tumores verrucosos (BERNEY et al. 2008). Por esta razão, não existe, até o presente momento, um marcador de proliferação com papel prognóstico definitivo no CP.

O receptor de fatores de crescimento epidérmico (EGFR) é amplamente expresso em CP, com positividade variando entre 88% e 100%

dos casos, sem associação com variáveis patológicas de prognóstico (LAVENS et al. 2010; CHAUX et al. 2013; GOU et al. 2013). A via Akt está alterada no CP, sendo que a expressão de Akt fosforilada está associada à expressão de EGFR fosforilado (STANKIEWICZ et al. 2011). Corroborando esses achados, a expressão imuno-histoquímica de marcadores da via mTOR (PTEN e formas fosforiladas de AKT, mTOR e S6) sugere desregulação desta via nesta neoplasia (CHAUX et al. 2013). A expressão de fosfo-mTOR está associada a metástases nos LN (FERRANDIZ-PULIDO et al. 2013).

EGFR surge, portanto, como um alvo candidato para terapias em CP (MINHAS 2014). Apesar de não haver, até o presente momento, entendimento claro da participação deste marcador na carcinogênese ou associação com prognóstico dos pacientes, existem dois ensaios clínicos abertos cadastrados na base do *National Institute of Health* (NIH) para pacientes com carcinoma de pênis cujo alvo é EGFR. Um deles em fase II, randomizado, utiliza cetuximab em pacientes metastáticos, tem final previsto para maio de 2016 (identificador NCT02014831). O outro, também fase II, utilizará Dacomitinib, um inibidor de EGFR e seus membros, com final previsto para abril de 2016 (identificador NCT01728233).

Há, ainda, estudos que relataram benefício clínico no uso de novas terapias, em especial com anticorpos monoclonais anti-EGFR, para pacientes com CP metastático (NECCHI et al. 2011; PANDEY et al. 2013; BROWN et al. 2014; MEN et al. 2014). Alguns têm relatos de casos isolados ou e pequena casuísticas ou de. Um deles reporta benefício clínico de dois

de três pacientes; e um paciente com progressão apesar do tratamento (BROWN et al. 2014). Essas abordagens terapêuticas e resultados destes estudos serão discutidos em tópico adiante sobre a terapia alvo de receptores tirosina-cinase (Seção 1.2.3).

1.2 RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO: A FAMÍLIA ERBB

A família ErbB (também chamada de família HER; do inglês *Human EGF Receptor*, ou receptor de fator de crescimento humano) é uma família de proteínas transmembrana que atua como receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina cinase (TK), e que tem papel importante em processos de proliferação, adesão, migração, diferenciação e sobrevivência celular (NORMANNO et al. 2006). É formada por quatro membros homólogos: EGFR (do inglês, *epidermal growth factor receptor*; também chamado de c-erbB-1 ou HER1), HER2 (ou c-erbB-2), HER3 (ou c-erbB-3) e HER4 (ou c-erbB-4) (OLAYIOYE et al. 2000).

De forma genérica, os receptores possuem três domínios distintos: um extracelular, responsável por reconhecer o ligante (fator de crescimento) solúvel e por permitir a formação dos dímeros, através do braço de dimerização (BD); um domínio transmembrana hidrofóbico, que ancora a proteína à membrana; e um domínio intracelular citoplasmático, com atividade tirosina-cinase (TK). Ao ser fosforilado, o domínio TK dispara dentro da célula diversas cascatas de sinalização como as vias

RAS/RAF/MAPK, mTOR e PI3K. Essas vias estão associadas a crescimento, proliferação e invasão celular (WIEDUWILT e MOASSER 2008). A representação dos três domínios desta proteína está na Figura 2 (A).

A ativação dos receptores da família ErbB se inicia através da ligação do fator de crescimento solúvel (como, por exemplo, o fator transformador de crescimento α , ou TGF α) ao receptor, causando nele uma mudança conformacional que expõe o BD, normalmente pouco acessível, permitindo o pareamento com outro receptor. É somente em pares (ou dímeros) que esses receptores podem ser ativados, pois a fosforilação dos domínios TK acontece de forma cruzada. Uma vez em dímeros (homodímeros – EGFR com EGFR – ou heterodímeros – EGFR com HER2), ocorre a fosforilação, que ativa os receptores e inicia as diversas vias celulares de crescimento (OLAYIOYE et al. 2000; SCALTRITI e BASELGA 2006; WIEDUWILT e MOASSER 2008). Um esquema do mecanismo de ativação dos receptores está representado na Figura 2.

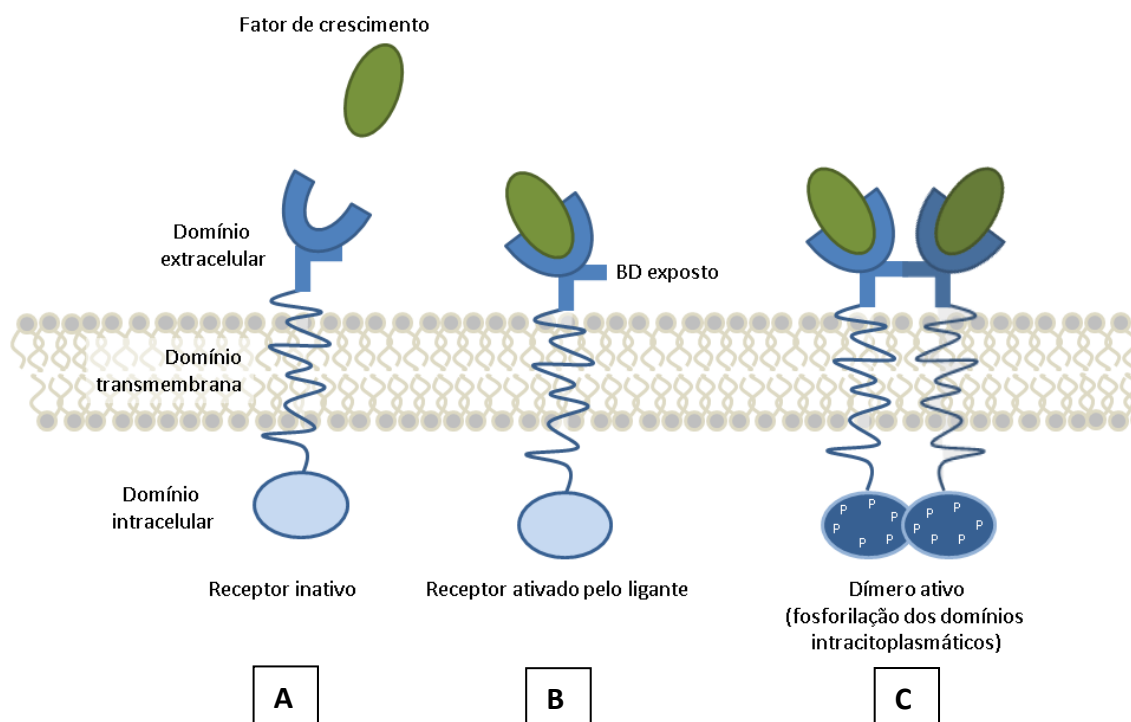


Figura 2 - Esquema da conformação dos dímeros e ativação cruzada dos receptores de fatores de crescimento epidérmico na membrana celular. Em (A), conformação do receptor inativo; (B) alteração conformacional degradada pelo reconhecimento de ligante e exposição do braço de dimerização (BD) e (C) dímero formado com fosforilação dos domínios tirosina-cinase citoplasmáticos.

1.2.1 HER1, ou EGFR

EGFR, membro protótipo da família, é uma proteína de 170 kDa codificada pelo gene homônimo localizado no cromossomo 7p12. Este receptor está superexpresso em até 90% dos casos de carcinoma oral, de esôfago, vulva e canal anal (GEBHART et al. 2004; ALVAREZ et al. 2006; CHUNG et al. 2006; DE MELO MAIA et al. 2014).

Em revisão de 200 estudos publicados na literatura, NICHOLSON et al. (2001) demonstraram o valor prognóstico deste marcador para diversos tumores. Em tumores de cabeça e pescoço, esôfago, colo de útero e bexiga,

aumento na expressão de EGFR foi associado com menor sobrevida global e livre de doença em 70% dos trabalhos e; em tumores gástricos, mamários, endometriais e colorretais, EGFR apresentou valor prognóstico moderado relacionando-se com menor sobrevida em 52% dos estudos. (NICHOLSON et al. 2001). Em tumores de pulmão (incluindo adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas), EGFR encontrou-se expresso em 63% dos casos, mais frequentemente em carcinomas de células escamosas, associado a mau prognóstico (ISAKSSON et al. 2013). Em carcinoma de cólon, não parece haver associação entre expressão e prognóstico (BAIOCCHI et al. 2009).

Na carcinogênese peniana, o papel de EGFR não é bem compreendido. Há relatos de expressão em 100% dos casos (LAVENS et al. 2010; GOU et al. 2013), e um único estudo que relatou ausência de expressão desse marcador em 12% dos 112 casos de CP avaliados, e, dos 99 casos (88%) positivos, metade deles apresentava baixa expressão, sem associação com significativa com prognóstico (CHAUX et al. 2013).

Em estudo anterior de nosso grupo que incluiu 183 amostras de carcinoma peniano, observamos uma positividade de 95,2% (122 casos). Desses, 91 apresentavam superexpressão do marcador, definida como marcação forte e completa de membrana em mais de 10% das células tumorais (ou 3+), associada com maior frequência de recidivas ($p=0.031$). Casos com marcação moderada de membrana (2+) e casos de superexpressão apresentaram maior risco de acometimento de metástases

em linfonodos ($p=0,045$) (SILVA 2010). Um resumo desses achados estão apresentados no Anexo 1.

A expressão da forma fosforilada do receptor foi relatada em 25% de uma série de 144 pacientes, e parece ser mais frequente em casos sem infecção por HPV (STANKIEWICZ et al. 2011).

Em alguns tumores como pulmão e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, o aumento do número de cópias do gene EGFR avaliado pela técnica de FISH está associado a menor sobrevida (HIRSCH et al. 2003; GEBHART et al. 2004; CAPPUZZO et al. 2005; CHUNG et al. 2006; TAOUDI BENCHEKROUN et al. 2010), mas também a melhor resposta a terapia alvo com inibidores de TK. Na maioria dos estudos, o aumento de cópias gênicas não se associa com os níveis de expressão da proteína (CHUNG et al. 2006; CAMPANELLA et al. 2010).

Especificamente em tumores de pulmão, uma característica importante é o status de mutação dos éxons codificadores do domínio TK de EGFR (éxons 18, 19, 20 e 21), que são constantemente encontradas, e cada uma delas tem valor preditivo distintos. A mutação L858R (no éxon 21) e a deleção A746-E750 (no éxon 19) são as que determinam maior sensibilidade ao tratamento (CAPPUZZO et al. 2005; RIELY et al. 2006; ROSELL et al. 2006a).

Essas mutações, entretanto, são raramente encontradas em outros tumores, e nem sempre apresentam o mesmo potencial de resposta ao tratamento (ROSELL et al. 2006b; CUI et al. 2013; BOECKX et al. 2014; DRENCKHAN et al. 2014). Mutações em outras regiões do gene, como a

deleção dos éxons 2 a 6 do domínio extracelular, gera uma proteína constitutivamente ativa, chamada EGFRvIII, mais frequentes em casos de cabeça e pescoço, por exemplo, e não se conhece seu valor preditivo de terapia alvo (KALYANKRISHNA e GRANDIS 2006).

No CP, dois estudos avaliaram mutações em *EGFR*. O primeiro avaliou, por imuno-histoquímica, duas mutações ativadoras: a deleção E746-A750 no éxon 19; e uma mutação pontual no éxon 21 (EGFR L858R). Os autores reportaram que apesar de EGFR ser expresso nas 30 amostras incluídas no *tissue microarray* (TMA), em nenhuma delas identificou-se as mutações estudadas (DI LORENZO et al. 2013). Em resposta a este estudo, publicamos parte dos resultados desta tese, afirmando que nenhuma das 29 amostras de CP sequenciadas para os éxons 18 a 19 de *EGFR* apresentaram alterações relevantes (SILVA et al. 2013). Detalhes estão descritos na seção 4.2 dos Resultados desta tese.

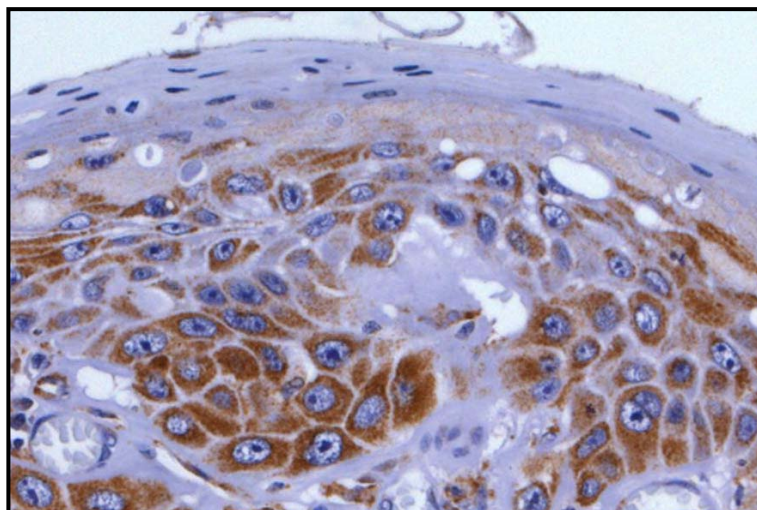
Apesar da ausência de demonstrações do envolvimento de EGFR na iniciação ou progressão da carcinogênese peniana, este receptor tem sido um alvo terapêutico no CP, e a maioria dos estudos utiliza sua expressão imuno-histoquímica e status de mutação de *K-RAS* (critérios usados para seleção de pacientes com carcinoma colorretal) para a seleção ao tratamento, apesar de não se conhecer, até o presente, o papel deste marcador na neoplasia peniana (NECCHI et al. 2011; PANDEY et al. 2013; BROWN et al. 2014; CARTHON et al. 2014; MEN et al. 2014).

1.2.2 HER2 (ou ErbB2)

Outro membro da família ErbB com importante papel terapêutico para pacientes com câncer é HER2. Codificado em 17q12, esse receptor tem 185 kDa e é o único membro da família para o qual não existem ligantes solúveis conhecidos. Isto se explica pela sua conformação que, mesmo no estado inativo, possui o braço de dimerização acessível, sem a necessidade de um ligante para expô-lo. Talvez também por esta razão seja o preferencial na formação de heterodímeros com os outros membros da família (HUDELIST et al. 2003; TAO e MARUYAMA 2008).

HER2 é geralmente superexpresso em adenocarcinomas, como os de mama, onde é superexpresso em cerca de 25% dos casos. É um marcador prognóstico bem estabelecido nestes casos, indicando maior agressividade da doença com necessidade de terapia adjuvante com anticorpos monoclonais (HUDELIST et al. 2003). É marcador de pior prognóstico também em tumores de estômago (BEGNAMI et al. 2011).

Um único estudo na literatura avaliou a expressão proteica de HER2 no câncer de pênis e os autores relataram que os 148 casos estudados eram negativos (STANKIEWICZ et al. 2011). Dados não publicados de nosso grupo, obtidos durante minha dissertação, também mostraram, através de imuno-histoquímica, que células tumorais de pênis não expressam HER2 em membrana, mas houve uma marcação citoplasmática nas células tumorais (SILVA 2010), como se observa na Figura 3.



Fonte: SILVA (2010)

Figura 3 - Marcação citoplasmática de HER2 em amostra de carcinoma de pênis.

Esta marcação citoplasmática, encontrada em aproximadamente 15% dos casos, esteve presente apenas em casos de alto grau histológico e foi fator de risco independente para óbito. Pacientes com tumores positivos para a expressão citoplasmática de HER2 apresentaram um risco quase três vezes superior de óbito (IC 95% [1,6–5,2]) do que pacientes sem esta marcação ($p < 0,001$) (SILVA 2010).

A presença de receptores em outras localizações subcelulares além da membrana plasmática, como núcleo e citoplasma, vem sendo reportada por diversos grupos. Estas moléculas podem estar presentes em sua forma integral ou em fragmentos, isoformas truncadas do receptor, solúveis, contendo apenas o domínio citoplasmático, como p95, fragmento de HER2 presente em subtipo agressivo de tumores de mama e associado com resistência a terapia com anticorpos anti-HER2 (CARPENTER 2003, ARRIBAS et al. 2011). Estes fragmentos podem ser gerados por

processamento proteolítico ou através de alteração do início da tradução. Independente da forma de geração, eles mantêm sua atividade cinase e a capacidade de estimular a motilidade celular, de induzir tumorigênese e metástase *in vitro* e ativar as mesmas vias intracelulares de sobrevivência que o receptor na forma integral; pois podem sofrer fosforilação (ANIDO et al. 2006; GARCÍA-CASTILLO et al. 2009; PEDERSEN et al. 2009).

Essa nova localização celular de HER2 foi reportada apenas em casos de carcinoma de mama que superexpressam HER2 em membrana. Essas moléculas podem prever o risco de resistência à terapia alvo com anticorpos como o Herceptin®, uma vez que já estão ativas no citoplasma celular; mas não à terapia baseada em inibidores de TK, como Lapatinib (ANIDO et al. 2006; SCALTRITI e BASELGA 2006; SCALTRITI et al. 2009; CHANDARLAPATY et al. 2010). A grande curiosidade nos casos de CP é que esses tumores não apresentam a isoforma de membrana. É possível que, nestes tumores, os fragmentos sejam ativados por outros membros da família ErbB, como EGFR, já que esses receptores atuam em dímeros. Essa informação é importante pelo potencial terapêutico de EGFR para pacientes com CP, já que os fragmentos de HER2 poderiam, por exemplo, desencadear resistência à terapia anti-EGFR, especialmente na abordagem baseada em anticorpos, em analogia ao que ocorre em casos de carcinoma mamário tratados com Herceptin® (ANIDO et al. 2006, SCALTRITI et al. 2009, ARRIBAS et al. 2011).

A amplificação de gene *HER2* está associada a tumores mais agressivos e menor sobrevida em tumores de mama, esôfago e estômago

(SATO-KUWABARA et al. 2009; BEGNAMI et al. 2011; JIANG et al. 2014). Ela é, geralmente, acompanhada pela amplificação de genes vizinhos, como a topoisomerase II α (ou *TOP2a*). Em alguns casos, amplificações de *TOP2a* são observadas apenas em casos com amplificação de HER2, podendo sugerir que *HER2* seja um amplicon *driver*, causando instabilidades que contribuam com a amplificação de genes adjacentes (JÄRVINEN e LIU 2003; LAMY et al. 2011; PRESS et al. 2011; FOUNTZILAS et al. 2013). Relatos de que o amplicon 17q12-q21 esteja associado com pior prognóstico em tumores de mama podem ser devido à ação de HER2 apenas (LAMY et al. 2011; ENGSTRØM et al. 2014).

1.2.3 Terapia alvo de EGFR e HER2

Por seu papel central na progressão de vários tipos de neoplasia, EGFR e HER2 são alvos para terapias anti-neoplásicas. Há duas abordagens principais: A primeira se baseia no uso de anticorpos monoclonais (MAb) que se ligam ao domínio extracelular do receptor na membrana, impedindo o reconhecimento do ligante e, por consequência, sua ativação. São exemplos cetuximab (Erbix®) e panitumumab (ABX-EGFR-Vectibix®), para EGFR; e Herceptin®, para HER2, entre outros (Figura 4 A). A segunda abordagem se baseia em pequenas moléculas que atuam como inibidoras da atividade tirosina-cinase intracelular. São exemplos gefitinib (Iressa®) e erlotinib (Tacerva®), que em geral atuam bloqueando inespecificamente os membros da família HER (HYNES e LANE 2005; SCALTRITI e BASELGA 2006; BAKER e REDDY 2010) (Figura 4 B).

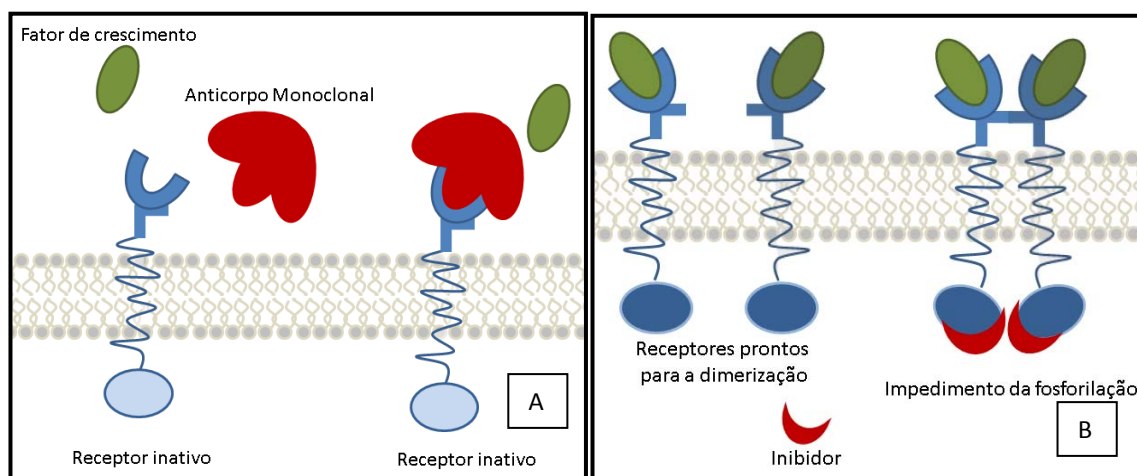


Figura 4 - Abordagens do uso de EGFR como alvo de terapia. Em (A), anticorpo monoclonal impede o reconhecimento do ligante no domínio extracelular do receptor. Em (B), pequeno inibidor impede a fosforilação dos domínios intracelulares.

A seleção de pacientes para qualquer uma dessas abordagens precisa ser criteriosa para que o benefício seja observado. No caso específico do alvo EGFR, os critérios ainda são controversos na literatura para os diversos tipos de tumores e variam desde superexpressão imuno-histoquímica do marcador, amplificação ou aumento de números de cópias gênicas de *EGFR* por FISH, mutação nos éxons codificadores do domínio tirosina-cinase (18 a 21), alterações em moléculas *downstream* nas vias ativadas por EGFR, como mutações em *K-RAS* e *B-RAF* (CAPPUZZO 2006; CHUNG et al. 2006; KALYANKRISHNA e GRANDIS 2006; RIELY et al. 2006; CAPPUZZO et al. 2007; DAHABREH et al. 2010; DUFFY et al. 2011; ISAKSSON et al. 2013).

A indicação para terapia alvo de HER2 é feita para pacientes com amplificação do gene *HER2* através da técnica de FISH, padrão-ouro para a seleção. Entretanto, a imuno-histoquímica pode ser utilizada, pois há boa

correlação nos casos negativos (casos sem marcação ou com marcação fraca e incompleta de membrana, que são classificados 0 e 1+, respectivamente), que não apresentam amplificação e não se beneficiam da terapia; e casos positivos (com marcação forte e completa de membrana, os casos 3+), que são encaminhados à terapia alvo. Casos com marcação moderada de membrana, os chamados *borderline* ou duvidosos, 2+ na imuno-histoquímica, são submetidos ao teste de FISH para a decisão sobre a terapia, pois a discordância entre as duas técnicas nessa categoria é significativa (WOLFF et al. 2007; PEREZ et al. 2014).

No CP, não se conhece o papel desses receptores no surgimento e progressão da doença e, como consequência, faltam critérios bem definidos para a seleção adequada de pacientes a esta terapia. Apesar disto, NECCHI et al. (2011) reportaram uma resposta clínica com o uso do anticorpo monoclonal panitumumab em um paciente com recidiva de tumor peniano cuja biópsia acusava carcinoma de células escamosas ceratinizante de alto grau com aumento de expressão (3+) de EGFR e ausência de mutação em *K-RAS*. Em duas semanas, houve diminuição dos edemas, da pigmentação dos nódulos, e também da dor e prurido, dispensando o uso de analgésicos e esteroides. Exames de imagem (PET/CT) se normalizaram a partir do sexto ciclo (NECCHI et al. 2011). Esse primeiro relato anedótico alertou a comunidade científica para um possível novo alvo terapêutico para esta neoplasia.

Um segundo anticorpo monoclonal, nimotuzumab, reduziu sintomas clínicos como edema e nódulos cutâneos em um caso de CP metastático.

Os autores reportaram desaparecimento de LN inguinal direito comprometido, mas não do esquerdo (PANDEY et al. 2013). Em análise retrospectiva, CARTHON et al. (2013) avaliaram a resposta de 24 pacientes que receberam terapia alvo de EGFR tanto baseada em MAb quanto em inibidores, combinados ou não com cisplatina. Resposta parcial foi observada em 1/5 pacientes que receberam apenas MAb, e em 3/12 dos que receberam MAb com cisplatina. E não se observou resposta objetiva em pacientes que receberam inibidores.

BROWN et al. (2014) avaliaram a resposta de três pacientes refratários ao tratamento baseado em platina. Um caso moderadamente diferenciado com expressão 1+ de EGFR apresentou 42 meses de sobrevida livre de doença. O segundo, caso de SCC bem diferenciado e também 1+ na imuno-histoquímica (IHQ), apresentou resposta clínica e radiográfica parcial, mas, após dois meses, houve recorrência local com progressão da doença com nódulos pulmonares. O óbito ocorreu em 8 meses. O terceiro caso era moderadamente diferenciado, sem mutação de *K-RAS* e 2+ na IHQ para EGFR. Após cinco ciclos, apresentou melhora dos sintomas e diminuição do tamanho do tumor. Porém, após dois meses, houve recorrência local.

Há ainda um relato de resposta parcial em paciente de PC com metástases nos LN inguinais após ressecção da lesão primária (MEN et al. 2014).

Os estudos reafirmam a importância de se considerar os critérios de seleção adequados para que os resultados da terapia sejam satisfatórios

(BROWN et al. 2014; CARTHON et al. 2014, MINHAS 2014). Entretanto, uma revisão afirma que nem os regimes baseados em platina (base da maioria dos ensaios clínicos) apresentam resultados superiores aos de EGFR, seja como terapia neoadjuvante ou como quimioterapia pós-cirurgia (SONPAVDE et al. 2013).

1.3 TOPOISOMERASE IIA (TOP2A)

Topoisomerases são enzimas que participam do empacotamento do DNA, controle essencial durante os processos de replicação e transcrição. No núcleo celular, elas estão envolvidas na condensação da cromatina, separação das cromátides durante a divisão celular e controle da tensão gerada pela abertura da dupla fita (CHAMPOUX 2001).

As topoisomerases II catalisam quebras transientes e reconstituição das fitas, o que permite que as fitas se desenrolem alterando a topologia do DNA. A forma α (TOP2a) catalisa quebras na dupla fita, e passam uma outra região de dupla fita através desta quebra, resolvendo a problemática topológica do enovelamento durante a replicação ou transcrição. Esta ação permite que o ciclo celular progrida mantendo o DNA estável (CHAMPOUX 2001).

Por este papel fisiológico, TOP2a é também um marcador de tecido em proliferação, especialmente cânceres (ROMERO et al. 2011, MILDE-LANGOSCH et al. 2013). Quando superexpressa, é possível que esta enzima cause mais quebras no DNA do que seja capaz de reparar, levando

a possíveis translocação gênicas. Alguns estudos reportam até aumento da apoptose *in vitro*, que pode ser desencadeada pelo excesso de quebras e dano não reparados (JÄRVINEN e LIU 2003).

O gene que codifica TOP2a está localizado em 17q21. Em cânceres de mama, a amplificação de TOP2a está associada à amplificação de HER2 e, conseqüentemente, a menor sobrevida e resposta a antraciclinas (JÄRVINEN e LIU 2003; LAMY et al. 2011; ROMERO et al. 2012; FOUNTZILAS et al. 2013).

A expressão imunohistoquímica de TOP2a em carcinoma de próstata, mama e também em sarcomas mostrou associação significativa com prognóstico desfavorável (SCHINDLBECK et al. 2010; CUNHA et al. 2012). A amplificação do gene não mostrou associação com níveis de expressão proteica em sarcomas (CUNHA et al. 2012) nem em adenocarcinomas de mama, mas os níveis de mRNA sim, e foram associados ao intervalo livre de doença (BRASE et al. 2010).

A amplificação de *TOP2a* em carcinomas mamários como marcador de pior prognóstico é controversa (SCHINDLBECK et al. 2010; DI LEO et al. 2011; ENGELSTAEDTER et al. 2012).

No CP, a expressão de TOP2a foi avaliada por imuno-histoquímica em 73 casos e se mostrou aumentada em casos com alto índice proliferativo medido por Ki-67 e em casos basaloides (BERNEY et al. 2008), um subtipo sabidamente de mau prognóstico e altas taxas de metástases (CUBILLA 2008, CHAUX e CUBILLA 2012), mas sem associação com direta com comprometimento de LN ou sobrevida reduzida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações moleculares (mutação e aumento de número de cópias gênicas) do receptor de fator de crescimento epidérmico EGFR, e também alterações de número de cópias gênicas de HER2, membro da mesma família, e topoisomerase II α (TOP2a), gene vizinho, em amostras de tecidos de carcinoma peniano. Ainda, a expressão de TOP2a, por seu valor como marcador de proliferação, foi avaliada através de imuno-histoquímica. Estes dados foram correlacionados com variáveis clínico-patológicas, risco de metástases nos linfonodos e sobrevida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, através de imuno-histoquímica, a expressão de duas formas mutadas da proteína EGFR: a deleção A746-E750, no éxon 19; e a mutação L858R, no éxon 21;
- Analisar a sequência dos éxons 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR*, codificadores do domínio tirosina-cinase;
- Avaliar o número de cópias dos genes *EGFR*, *HER2* e topoisomerase α (*TOP2a*) por hibridação *in situ* fluorescente (FISH);

- Avaliar a expressão de TOP2a, por imuno-histoquímica;
- Associar todas as variáveis citadas acima com variáveis clínicas, patológicas, risco de metástases nos linfonodos e sobrevida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

As amostras avaliadas foram coletadas de forma retrospectiva e prospectiva no Centro de Tratamento e Pesquisa A.C.Camargo Cancer Center. Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de tumor primário de pênis admitidos na instituição a partir de 1953 submetidos à cirurgia. Foram excluídos pacientes que tenham outro tumor primário ou metástase à distância no momento do diagnóstico, ou que tenham sido submetidos à terapia neoadjuvante. Para as análises em material armazenados em blocos de parafina, foram selecionadas amostras de 135 pacientes e, para as análises em material congelado, de 29 pacientes.

A média da idade dos pacientes incluídos nesta casuística foi de 55,3 anos, sendo a mediana de 55 anos e moda 50. DNA do HPV foi encontrado em 20,9% dos 67 casos.

A grande maioria dos pacientes não havia realizado postectomia no período neonatal (96,1%), realizou a primeira intervenção na Instituição (60,0%) e foi diagnosticada com doença avançada (91,2% em estágio T clínico de pelo menos T2). Aproximadamente metade dos pacientes não apresentava linfonodos comprometidos na avaliação clínica (54,8%) e um quarto (25,9%) apresentou recidiva da doença. Destes, apenas um paciente não apresentava linfonodos palpáveis no momento da cirurgia (Tabela 1).

Do ponto de vista patológico, a maioria dos casos eram carcinoma de células escamosas do tipo usual (84,4%), de grau histológico de intermediário a alto (78,1%), sem invasão vascular ou linfática (77,7%), sem invasão perineural (70,0%) Dos 57 pacientes submetidos a linfadenectomia, 23 (40,0%) não apresentaram linfonodos positivos no exame patológico. Outras características demográficas, clínicas e patológicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano avaliados no presente estudo.

Características	N	%
Postectomia		
Não realizada	107	83,6
Realizada, não relacionada ao câncer	5	3,9
Realizada, relacionada ao câncer	16	12,5
<i>Sem informação</i>	7	
Histórico de antecedentes venéreos		
Ausente	48	63,2
Presente	28	36,8
<i>Sem informação</i>	59	
Situação na primeira consulta		
Biópsia prévia	47	35,3
Cirurgia prévia (amputação)	5	3,8
Sem intervenção	81	60,0
<i>Sem informação</i>	2	
Infeção por HPV		
Ausente	53	79,1
Presente	14	20,9
<i>Sem informação</i>	68	
Estadio T		
T1a	3	2,2
T1b	9	6,7
T2	71	52,6
T3	48	35,6
T4	4	3,0

Cont/ Tabela 1

Características	N	%
Estadio N		
N0	74	54,8
N1	26	19,3
N2	33	24,4
Nx	2	1,5
Grau Histológico		
Baixo	28	20,9
Intermediário	51	38,1
Alto	55	40,0
Invasão Vascular ou Linfática		
Ausente	101	77,7
Presente	29	22,3
<i>Sem informação</i>	4	
Invasão Perineural		
Ausente	91	70,0
Presente	39	30,0
<i>Sem informação</i>	4	
Infiltração do Corpo Esponjoso		
Ausente	12	10,3
Presente	105	89,7
<i>Sem informação</i>	18	
Infiltração do Corpo Cavernoso		
Ausente	45	39,1
Presente	70	60,9
<i>Sem informação</i>	20	
Infiltração da Uretra		
Ausente	59	59,6
Presente	40	40,4
<i>Sem informação</i>	36	
Padrão de Crescimento		
Exofítico	30	23,6
Infiltrativo	97	76,4
<i>Sem informação</i>	8	
Linfadenectomia		
Não realizada	78	57,8
Realizada	57	42,2
Linfonodos comprometidos (exame patológico)		
Ausente	23	40,4
Presente	34	59,6
<i>Não avaliados</i>	78	
Recidiva da doença		
Ausente	100	74,1
Presente	35	25,9

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center sob o número 1445/10. (Anexo 2)

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Foram avaliadas através da técnica de IHQ a expressão de duas formas mutadas de EGFR frequentemente encontradas em casos de adenocarcinoma de pulmão: a) a mutação L858R no éxon 21; e b) a deleção A746-E750 no éxon 19; e também a expressão do marcador de proliferação celular topoisomerase II α (TOP2a). Os dados dos anticorpos utilizados nesses ensaios estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para a análise da expressão de duas isoformas mutadas de EGFR (mL858R e delA746-E759) e de TOP2a.

Proteína alvo	Clone do anticorpo	Fabricante	Diluição
EGFR – mutação L858R	SP111	Roche®	Pronto para uso
EGFR – deleção A746-E750	SP125	Roche®	Pronto para uso
TOP2a	SWT3D1	Dako®	1:800

As reações foram sempre acompanhadas de um controle positivo, que, para TOP2a, foi um caso de carcinoma de mama e, para os mutantes de EGFR, são casos de adenocarcinoma de pulmão já sequenciado e positivo para as alterações de interesse.

3.2.1 IHQ automatizada para formas mutadas de EGFR

Para a avaliação de mutação de EGFR, as reações de imunohistoquímica foram realizadas de forma automatizada no equipamento Ventana BenchMark XT (ROCHE®).

A desparafinização dos cortes foi realizada sem a necessidade do uso de xilol, com o reagente EZPrep (ROCHE®) e sucessivas lavagens com Reaction Buffer (ROCHE®). A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se a solução Cell Conditioner (ROCHE®) por 64 minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito com UV INHIBITOR (ROCHE®) e, após séries de lavagens com Reaction Buffer, o anticorpo primário específico foi incubado por 16 minutos. A revelação foi feita com o sistema Optiview (ROCHE®) e a contra coloração foi feita com HEMATOXYLIN II (ROCHE®) e BLUING REAGENT (ROCHE®). Após serem retiradas do equipamento, as lâminas foram submetidas à desidratação em banhos sucessivos de álcool e xilol e montagem automatizada no equipamento Tissue-Tek® Prisma®/Film® (SAKURA).

A avaliação foi feita através de observação em microscopia convencional, sempre acompanhada de um patologista. Foram considerados positivos casos apresentando qualquer marcação em membrana e citoplasma de células tumorais.

3.2.2 IHQ convencional manual para TOP2a

As lâminas foram desparafinadas através de lavagens em xilol, reidratação em álcool etílico seguida por lavagem em água corrente. A

recuperação antigênica foi feita por calor úmido em panela de pressão a 98°C por 15 minutos em tampão citrato (pH 6.0).

Após bloqueio de peroxidase endógena (pela adição de água oxigenada 30 volumes por três vezes, durante 5 minutos), foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas (Dako Protein Block Serum-Free, por 20 minutos). A incubação com o anticorpo primário ocorreu por duas horas em câmara úmida, em temperatura ambiente.

A amplificação do sinal foi feita por sistema de polímero (DAKO). Após lavagens, foi adicionado o DAKO Advanced Link por 30 minutos e, após nova lavagem, o DAKO Advanced Enzyme por mais trinta minutos. As lâminas foram coradas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos, e contra coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto. As lâminas foram montadas no equipamento Tissue-Tek®FILM (Sakura®). As reações foram sempre acompanhadas de um controle positivo em tecido sabidamente positivo, já padronizado pela rotina do hospital.

A avaliação das reações foi feita no equipamento Aperio Scanscope, que consiste no escaneamento das lâminas e delimitação das áreas de interesse no computador. O algoritmo utilizado para analisar a expressão de TOP2a foi o *Nuclearv1*, que realiza a contagem de núcleos marcados e calcula a porcentagem deles dentro de uma área tumoral previamente delimitada pelo pesquisador. A partir deste valor de porcentagem de núcleos marcados, estabeleceu-se o valor de 30% para determinar casos positivos para TOP2a, como descrito para este marcador em outros tumores (BERNEY et al. 2008).

3.3 SEQUENCIAMENTO

DNA genômico de células de 29 casos de carcinoma de pênis foi extraído e submetido ao sequenciamento direto dos éxons 18, 19, 20 e 21 do gene *EGFR* (NM_005228). Cada éxon foi amplificado individualmente através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se 100 ng de DNA genômico, 0,4 uM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 2,0 mM de $MgCl_2$ e 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) em um volume final de reação de 20 ul. Os produtos da PCR foram purificados com ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) e seqüenciados nas duas direções. As reações foram realizadas com Big Dye v.3.1 (Applied Biosystems, USA) e separadas em ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, USA). Todas as sequências foram analisadas pelo software CLC Bio e comparadas com a sequência referência de EGFR.

3.4 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Cento e vinte nove casos de CP foram selecionados para análise por FISH por possuírem material tumoral disponível em arquivos.

Os cortes embebidos em parafina foram desparafinizados de forma semelhante ao descrito no item 3.2.2., adicionando-se um banho em solução 0,2N de HCl por 20 minutos. As lâminas foram submetidas a um pré-tratamento em tampão citrato pH6,0 a 80°C em banho-maria durante uma hora, e posteriormente incubadas com proteinase K durante 25 minutos.

Após lavagens com SSC (Stringent wash buffer, Dako®) e banhos em álcool, foi adicionada a sonda (conforme Tabela 3).

Tabela 3 - Sondas utilizadas para a análise de número de cópias gênicas de *EGFR*, *HER2* e *TOP2a*.

Sondas	Fabricante	Gene	Centrômero
<i>ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe</i>	Zytovision®	<i>EGFR</i>	Crom. 7
<i>TOP2A (17q21) / Her2 (17q12) / SE 17 Triple Color Probe</i>	Kreatech®	<i>TOP2a e HER2</i>	Crom. 17
<i>Vysis TOP2A / CEP 17 FISH Probe Kit</i>	Abbott Molecular®	<i>TOP2a</i>	Crom. 17

A incubação ocorreu no hibridador da seguinte forma: por 5 minutos a 82°C, para a denaturação das fitas de DNA; seguidos de 18 horas a 45°C para hibridação da sonda ao tecido. As lâminas foram lavadas e o corante DAPI foi adicionado.

Os cortes foram avaliados em microscópio de fluorescência.

A análise foi sempre acompanhada de um patologista, sendo feita de acordo com os critérios previamente descritos para análise de *EGFR* (CAPPUZZO et al. 2005; CHUNG et al. 2006). Resumidamente, casos apresentando dois sinais de cada sonda foram considerados sem alteração (dissomia); casos apresentando três ou mais sinais de cada sonda foram considerados polissomia e casos com mais sinais do gene em comparação com sinais do centrômero (razão gene/centrômero ≥ 2) foram considerados amplificação.

3.5 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS for Windows 18.0, SPSS Inc. A distribuição das variáveis clínicas e anatomopatológicas estão apresentadas na forma de tabelas de contingências.

As associações entre variáveis qualitativas, expressão protéica, alteração no número de cópias gênicas e presença de metástase linfonodal foram feitas pelo teste do qui-quadrado bi-caudal. De acordo com os valores obtidos nas Tabelas 2x2, utilizou-se o valor do qui-quadrado bi-caudal corrigido (Teste de Fisher).

A identificação dos fatores independentes relacionados com metástase linfonodal e com a expressão dos marcadores estudados assim como alterações no número de cópias gênicas foi realizada pela regressão logística múltipla.

As taxas de sobrevida global e câncer-específica foram estimadas pelo método Kaplan Meier e a comparação entre as curvas será feita através do teste de Log-rank. Para a análise multivariada para sobrevida, usou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox.

A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FORMAS MUTADAS DE EGFR

4.1.1 Mutação L858R

As reações foram padronizadas utilizando tecido de adenocarcinoma de pulmão. Na Figura 5 pode se observar o controle da reação (A), um caso de adenocarcinoma de pulmão positivo no sequenciamento para esta alteração. Em (B), detalhe da marcação de citoplasma e também de membrana apresentado com este anticorpo no tecido controle.

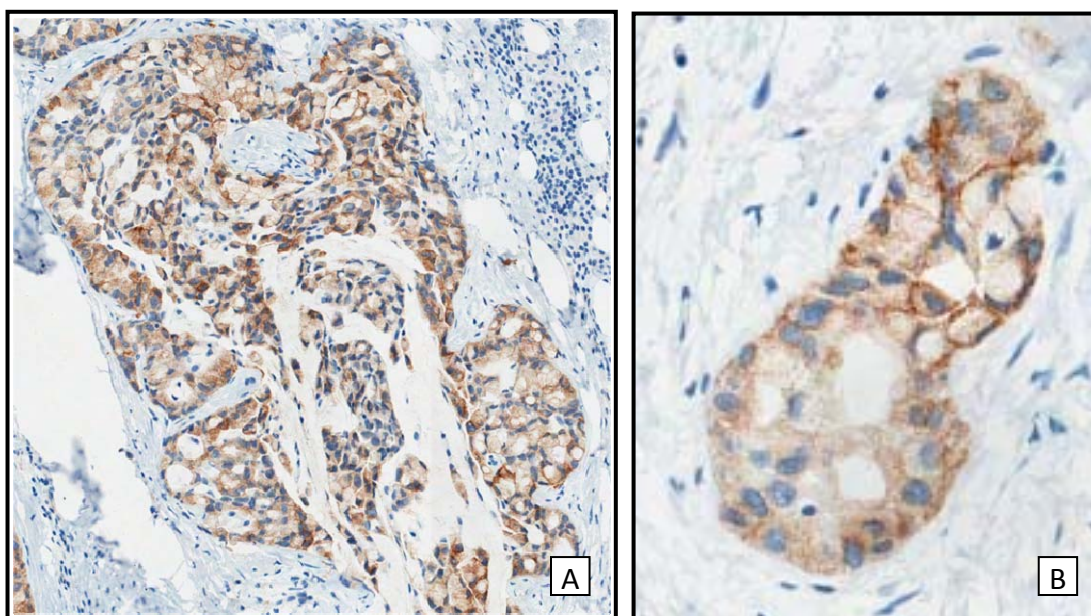


Figura 5 - Marcação positiva do anticorpo que reconhece a mutação L858R no éxon 21 em amostra de adenocarcinoma de pulmão. Em (A), marcação em maior aumento; em (B), detalhe da marcação na membrana das células tumorais. Aumento original: 50x e 100x

Os 104 casos de carcinoma peniano que apresentaram material tumoral nas lâminas avaliadas foram todos negativos para a marcação do anticorpo que reconhece a mutação L858R. Na Figura 6, observam-se exemplos destes casos.

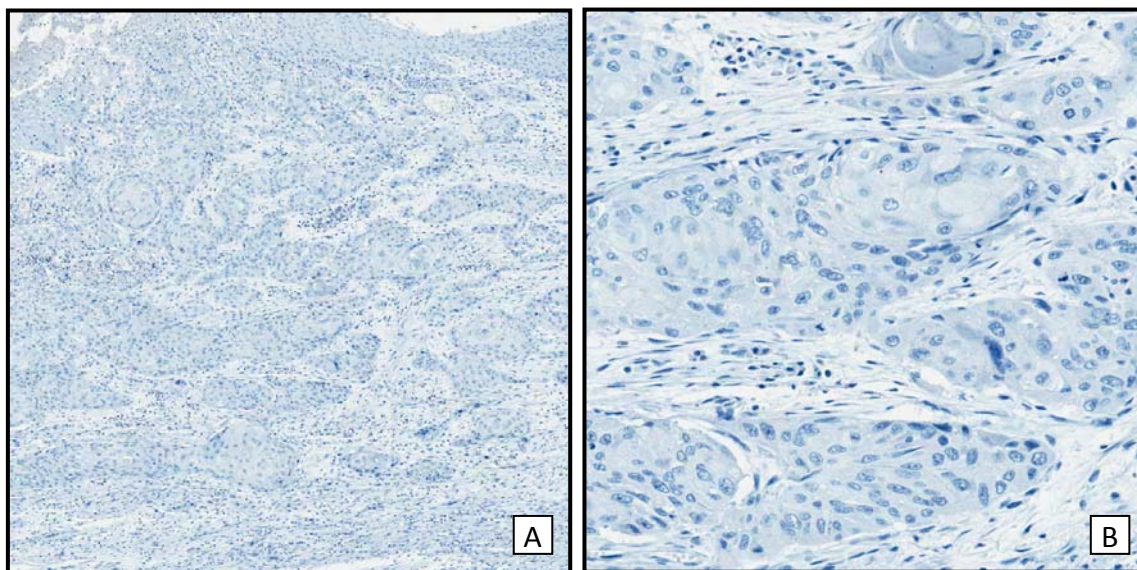


Figura 6 - Imagens de caso de carcinoma de pênis negativo para a mutação L858R. Em menor (A) e maior (B) detalhe das células tumorais. Aumento original: 20x.

4.1.2 Deleção A746-E750

Para a padronização do anticorpo que reconhece a deleção A746-E750 no éxon 19 do gene EGFR, foi usado como controle tecido de carcinoma de pulmão positivo para esta alteração no sequenciamento. Na Figura 7 se observa o padrão de marcação forte no citoplasma. Em maior aumento (B), observa-se também marcação de membrana.

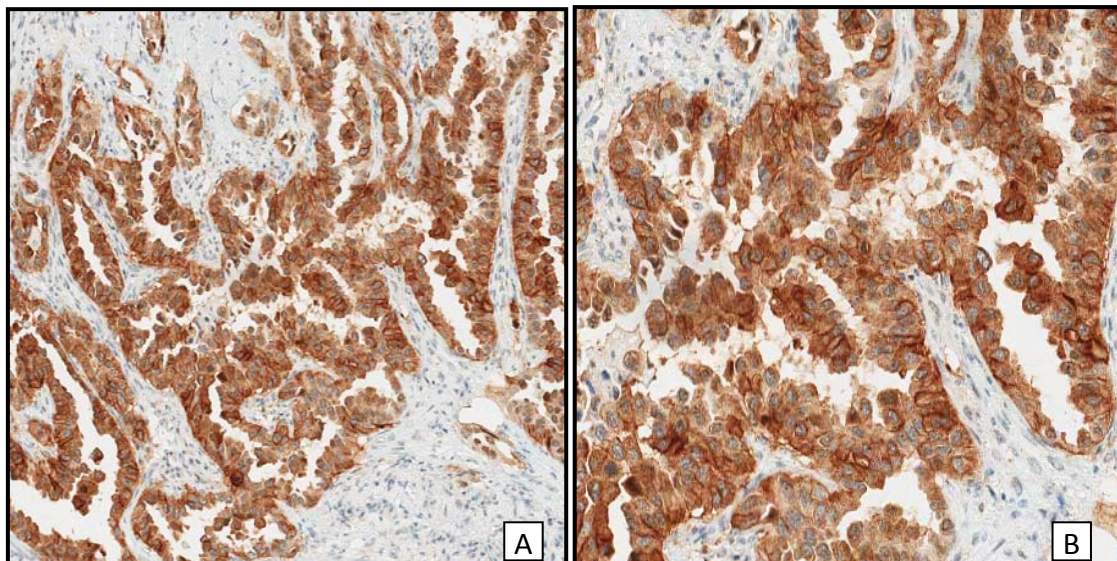


Figura 7 - Marcação positiva do anticorpo que reconhece a deleção A746-E750 no éxon 19 em caso de adenocarcinoma de pulmão. Em (A), marcação positiva e em (B), detalhe da marcação na membrana das células tumorais. Aumento original: 50x e 100x

Todos os 104 casos de carcinoma peniano avaliados foram negativos para o anticorpo que reconhece a deleção A746-E750. A Figura 8 mostra casos de CP negativos para a marcação. Na Figura 8 (B), é possível observar que alguns casos apresentam marcação de citoplasma em menos de 5% das células tumorais.

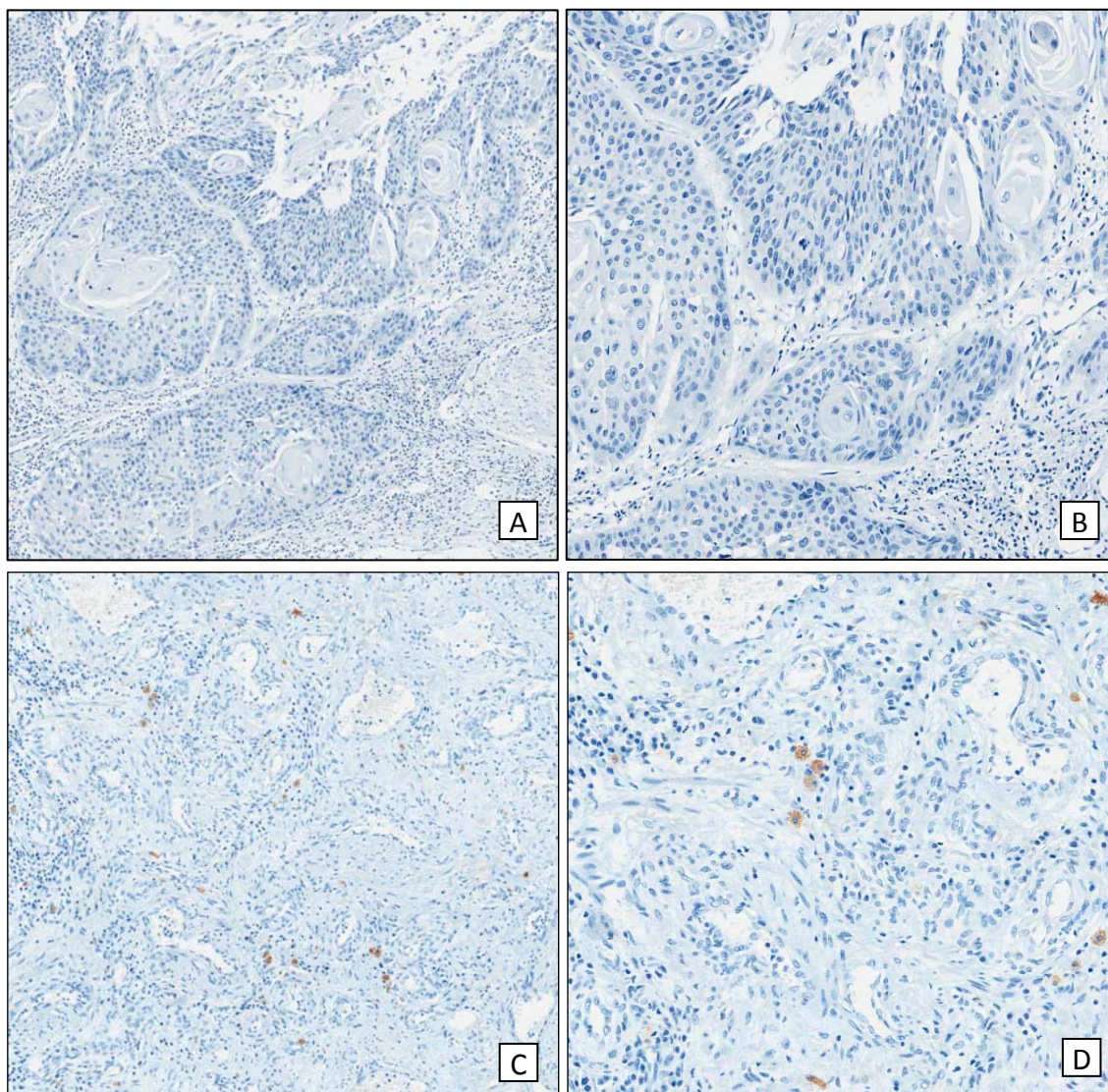


Figura 8 - Imagens de caso de carcinoma de pênis negativo para a deleção A746-E750. Em (A) e (C), aumento original de 4x e em (B) e (D), detalhe das células tumorais com aumento de 20x.

4.2 SEQUENCIAMENTO DOS ÉXONS 18, 19, 20 E 21 DE EGFR

Nenhuma das 29 amostras tumorais sequenciadas apresentaram alterações relevantes nos éxons 18, 19, 20 ou 21 de *EGFR*. Entretanto, 19/29 amostras apresentaram uma alteração no éxon 20 (p.Q787Q), que é considerado um polimorfismo de base única (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*).

Esses resultados foram publicados (SILVA et al. 2013) e o artigo se encontra no Anexo 3 desta tese.

4.3 ANÁLISE DE NÚMERO DE CÓPIAS GÊNICAS PELA TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

4.3.1 Análise de Número de cópias Gênicas de *EGFR*

Cento e vinte nove casos de carcinoma peniano de células escamosas foram submetidos à análise de FISH, mas apenas 68 casos (52,7%) mostraram sinais avaliáveis das sondas. Esta alta taxa de casos não avaliáveis se deve, possivelmente, a elementos pré-analíticos, ou ao fato de muitos dos tumores serem altamente ceratinizados, o que dificulta a penetração da sonda no núcleo celular.

Dos 68 casos válidos, 46 (79,3%) não mostraram alterações no número de cópias; ou seja, apresentavam dissomia com média de dois sinais do gene *EGFR* e dois sinais do centrômero do cromossomo 7 por núcleo. Dezesesseis casos (23,5%) apresentaram polissomia do cromossomo

7 (com mais de 4 sinais das sondas por núcleo), e seis casos (8,9%) apresentaram ganhos ou amplificação de *EGFR*. Dos casos com amplificação, a maioria (5/6) apresentou ganho de 3 a 6 cópias por célula. Apenas um único caso apresentou amplificação em *cluster* (com mais de 20 sinais do gene por célula).

Um exemplo de cada categoria pode ser observado na Figura 9, onde se vê em vermelho o centrômero do cromossomo 7 e, em verde, o sinal do gene *EGFR*.

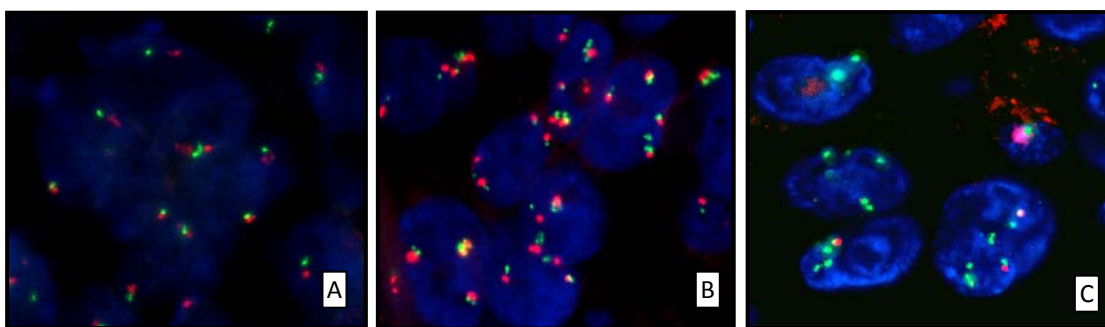


Figura 9 - Categorias observadas nas análises de FISH com sonda dupla para o gene *EGFR* (em verde) e o centrômero do cromossomo 7 (em vermelho): (A): Caso sem alteração; (B): Caso com polissomia do cromossomo 7; (C): Caso com amplificação de *EGFR*.

Tanto os casos com amplificação de *EGFR* quanto os que possuíam polissomia do cromossomo 7, ainda que com o pequeno aumento do número de cópias (de 3 a 6 cópias), apresentaram sobrevida significativamente reduzida, quando comparados com os casos sem alteração no número de cópias ($p=0,007$).

Cinco anos após o diagnóstico, 93,7% dos casos sem alteração estavam vivos, enquanto a sobrevida dos casos com polissomia do cromossomo 7 e amplificação de *EGFR* foi de 55,9% e 33,3%, respectivamente (Figura 10).

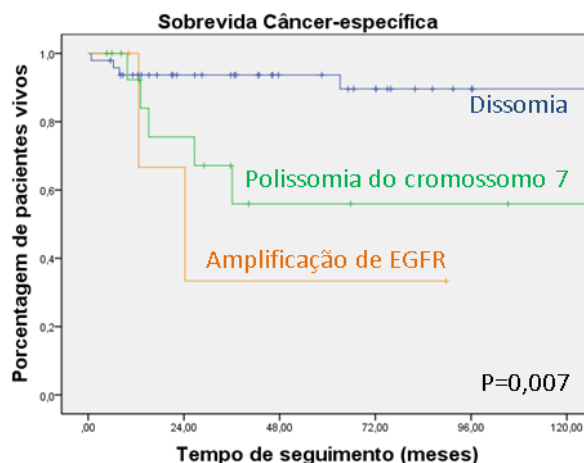


Figura 10 - Sobrevida câncer-específica dos pacientes de acordo com as categorias de alterações de número de cópias avaliadas pela técnica de FISH para o gene *EGFR*.

Em decorrência da semelhança no prognóstico, casos com polissomia do cromossomo 7 e com amplificação de *EGFR*, nas análises posteriores, serão agrupadas e chamadas de casos com aumento do número de cópias gênicas de *EGFR* (*ancEGFR*). Estes casos representaram 32,4% da amostra estudada.

4.3.2 Análise de número de cópias gênicas de *HER2* e *TOP2a*

Apenas os casos que apresentaram sinal válido na técnica de FISH na análise de *EGFR* foram incluídos para esse novo ensaio. Foram usadas

duas sondas distintas: uma com três fluoróforos marcando *HER2*, *TOP2a* e centrômero do cromossomo 17 (Cep17); e outra com dois fluoróforos, marcando *TOP2a* e Cep17.

- **Sonda tripla: *HER2*, *TOP2a* e centrômero do cromossomo 17**

Com a sonda tripla foram avaliados 15 casos. Dois desses casos não apresentaram sinal válido e os 13 casos restantes apresentam dissomia (com média de dois sinais de cada fluoróforo por núcleo; sendo o fluoróforo verde o que representa *TOP2a*, o vermelha *HER2* e o amarelo o centrômero do cromossomo 17, que não aparece na imagem por ser muito próxima ao azul do DAPI), como mostrado na Figura 11.

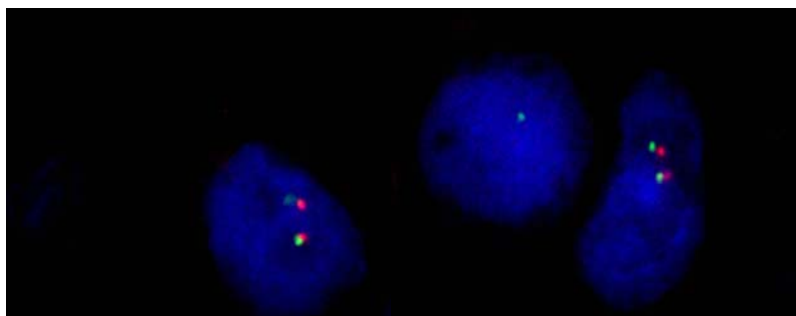


Figura 11 - Categorias observadas nas análises de FISH com sonda tripla para *HER2*, *TOP2a* e centrômero do cromossomo 17 demonstrando um exemplo de dissomia.

- **Sonda dupla: *TOP2a* e centrômero do cromossomo 17**

Cinquenta e oito casos de carcinoma de células escamosas de pênis foram submetidos à técnica de FISH para a análise do número de cópias desses dois genes simultaneamente. Nove deles não apresentaram sinal

avaliável. Dos 49 casos válidos, a maioria (37, ou 75,5%) apresentaram dissomia e 12 casos apresentaram polissomia do cromossomo 17 (P17).

A Figura 12 mostra um exemplo de cada categoria. Em verde, o sinal do centrômero do cromossomo 17 e em vermelho, do gene *TOP2a*.

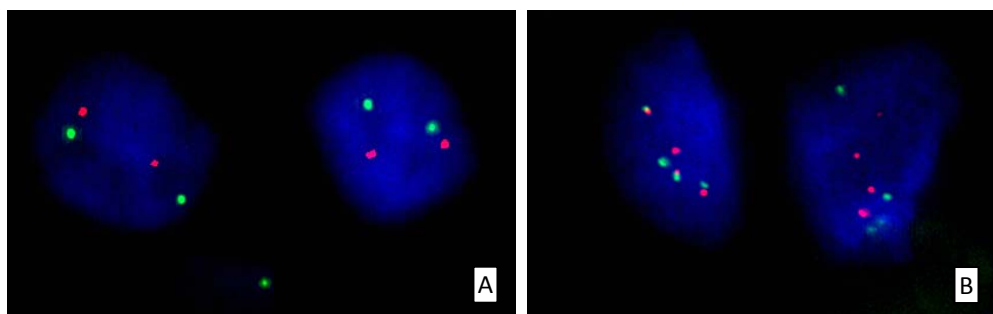


Figura 12 - Categorias observadas nas análises de FISH com sonda dupla para o gene *HER2* e o centrômero do cromossomo 17: (A): Caso sem alteração; (B): Caso com polissomia do cromossomo 17.

No total, foram avaliados 53 casos de CP, sendo que doze deles (22,6%) apresentaram P17. Nenhum caso com amplificação de *HER2* ou *TOP2a* foi observado.

4.4 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA TOPOISOMERASE IIA

A marcação imuno-histoquímica da topoisomerase II α (TOP2a) é nuclear e se apresentou de forma heterogênea na maioria das amostras, como pode ser observado na Figura 13 - em menor aumento (A) e em detalhe (B).

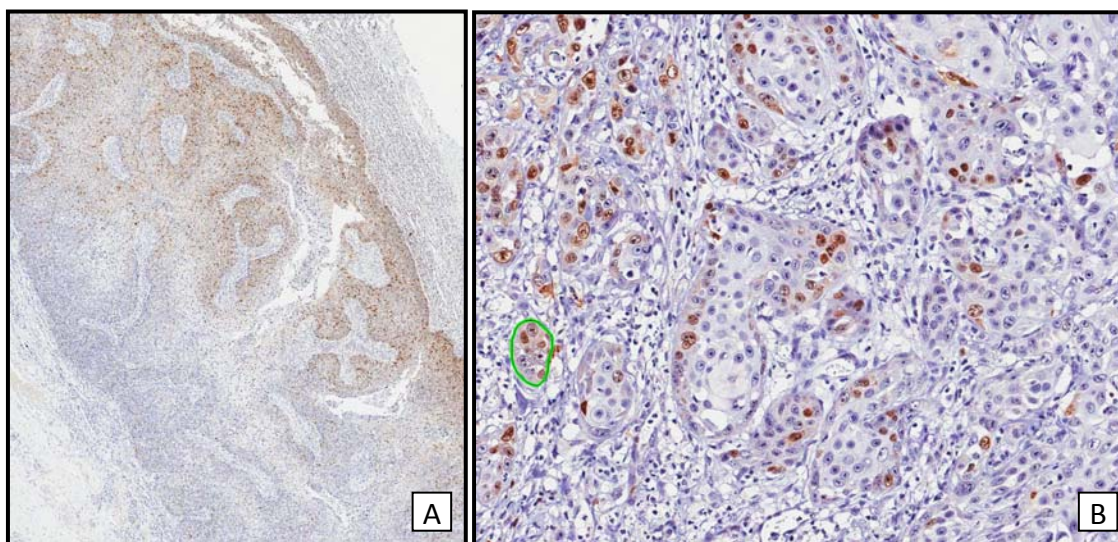


Figura 13 - Imagens da marcação heterogênea de TOP2a em amostras de carcinoma peniano. (A) Aumento 4x e (B), em detalhe, aumento 20x.

Preferencialmente, foram avaliadas as áreas de frente de invasão, que se caracterizam por pequenos blocos de células tumorais, em geral pouco diferenciadas.

A média de células positivas nos casos avaliados foi de 24,11% (desvio padrão de 11,98). O mínimo foi 2,43% e o máximo 60,51%.

A maioria dos 109 casos avaliados (74,2%) apresentou positividade para o marcador. A avaliação foi feita de forma digitalizada pelo Aperio Scanscope que conta os núcleos marcados dentro da área delimitada pelo pesquisador. Casos com menos de 30% de núcleos marcados foram considerados negativos (BERNEY et al. 2008) e representaram 70,6% (84 casos) da amostra, e um deles está demonstrado na Figura 14A; enquanto um dos casos positivos (que representaram 29,4% dos casos) está mostrado na Figura 14B.

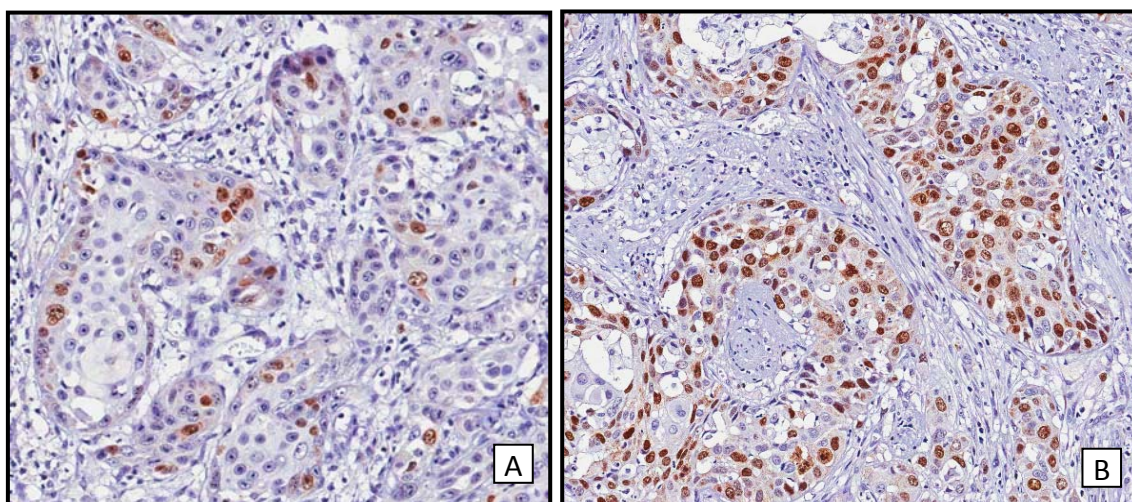


Figura 14 - Imagens dos casos de carcinoma peniano avaliados quanto à expressão TOP2a. Em (A), amostra negativa e (B) positiva, com 30% dos núcleos tumorais marcados. Aumento: 20x

4.5 ASSOCIAÇÃO DAS VARIÁVEIS MOLECULARES COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS

4.5.1 Aumento do número de cópias de EGFR (*ancEGFR*) e associações com variáveis clínicas e patológicas

O aumento do número de cópias gênicas de EGFR (*ancEGFR*) estiveram associados com tumores de grau histológico intermediário a alto ($p=0,014$). Não houve associação com a expressão de EGFR por imunohistoquímica, avaliada anteriormente (SILVA 2010) (agrupamento (1), $p>0,999$) nem com a superexpressão (agrupamento (2), $p=0,772$). Demais associações estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Associação entre número de cópias gênicas de *EGFR* por FISH e dados clínicos e patológicos dos casos de carcinoma peniano.

Características	EGFR por FISH		P
	Dissomia	Aumento de cópias	
Estadio T			
T1	3 (100,0%)	0 (0,0%)	0,547**
T2, T3 e T4	44 (67,7%)	21 (32,3%)	
Estadio N			
N0	25 (73,5%)	9 (26,5%)	0,437**
N1-N2	21 (63,6%)	12 (36,4%)	
Infecção por HPV			
Ausente	16 (66,7%)	8 (33,3%)	0,399*
Presente	4 (50,0%)	4 (50,0%)	
Grau Histológico			
Baixo	16 (94,1%)	1 (5,9%)	0,014**
Intermediário ou Alto	31 (60,4%)	21 (39,6%)	
Invasão Vascular ou Linfática			
Ausente	39 (75,0%)	13 (25,0%)	0,106*
Presente	8 (53,3%)	7 (46,7%)	
Invasão Perineural			
Ausente	35 (74,5%)	12 (25,5%)	0,236*
Presente	12 (60,0%)	8 (40,0%)	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Ausente	3 (75,0%)	1 (25,0%)	>0,999*
Presente	41 (70,7%)	17 (29,3%)	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Ausente	16 (66,7%)	8 (33,3%)	0,832*
Presente	27 (69,2%)	12 (30,8%)	
Infiltração da Uretra			
Ausente	22 (68,8%)	10 (31,2%)	0,519*
Presente	12 (60,0%)	8 (40,0%)	
Padrão de Crescimento			
Exofítico	17 (77,3%)	5 (22,7%)	0,397*
Infiltrativo	27 (64,3%)	15 (35,7%)	
Expressão de EGFR por IHQ (1)			
Negativa	2 (100,0%)	0 (0,0%)	>0,999*
Positiva (1+, 2+ e 3+)	45 (68,2%)	21 (31,8%)	
Expressão de EGFR por IHQ (2)			
Baixa expressão (0, 1+ e 2+)	14 (70,0%)	6 (30,0%)	0,748**
Superexpressão (3+)	33 (66,0%)	17 (34,0%)	

* Teste do Chi-quadrado de Pearson / ** Teste Exato de Fisher

4.5.2 Polissomia do Cromossomo 17 e associações com variáveis clínicas e patológicas

As análises estatísticas mostraram associação significativa entre polissomia do cromossomo 17 (P17) e a presença de recidiva ($p < 0,001$), infiltração de uretra ($p = 0,022$) e invasão perineural ($p = 0,044$) mas não com a expressão citoplasmática de HER2 ($p > 0,999$) avaliada anteriormente (SILVA 2010). A associação com aumento de número de cópias de EGFR não atingiu significância estatística ($p = 0,068$). Estas e demais associações não significativas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Associação entre polissomia do cromossomo 17 por FISH e dados clínicos e patológicos nos casos de carcinoma peniano.

Características	Cromossomo 17		P
	Dissomia	Polissomia	
Estadio T			
T1	5 (100,0%)	0 (0,0%)	0,573**
T2, T3 e T4	45 (78,9%)	12 (21,1%)	
Estadio N			
N0	26 (83,9%)	5 (16,1%)	0,749**
N1-N2	24 (83,3%)	7 (22,6%)	
Infecção por HPV			
Ausente	17 (70,8%)	5 (16,1%)	0,150**
Presente	8 (100,0%)	0 (0,0%)	
Grau Histológico			
Baixo	12 (100,0%)	0 (0,0%)	0,100**
Intermediário ou Alto	38 (82,4%)	12 (17,6%)	
Invasão Vascular ou Linfática			
Ausente	43 (86,0%)	7 (14,0%)	0,081**
Presente	7 (63,6%)	4 (12,5%)	
Invasão Perineural			
Ausente	38 (88,4%)	5 (11,6%)	0,044*
Presente	12 (66,7%)	6 (33,3%)	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Ausente	6 (100,0%)	0 (0,0%)	0,577**
Presente	42 (80,8%)	10 (19,2%)	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Ausente	23 (85,2%)	4 (14,8%)	0,518**
Presente	24 (77,4%)	7 (22,6%)	
Infiltração da Uretra			
Ausente	28 (87,5%)	4 (12,5%)	0,022*
Presente	8 (57,1%)	6 (42,9%)	
Padrão de Crescimento			
Exofítico	12 (75,0%)	4 (25,0%)	0,444*
Infiltrativo	36 (83,7%)	7 (16,3%)	
Recidiva			
Ausente	44 (89,8%)	5 (10,2%)	<0,001*
Presente	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
Expressão de HER2 por IHQ			
Negativa	39 (79,6%)	10 (20,4%)	>0,999**
Positiva	11 (84,6%)	2 (15,4%)	
Número de cópias de EGFR			
Dissomia	24 (88,9%)	3 (11,1%)	0,068**
Aumento de cópias	11 (78,6%)	6 (21,4%)	

* Teste do Chi-quadrado de Pearson / ** Teste Exato de Fisher

A P17 não apresentou associação significativa com o *ancEGFR* ($p=0,068$); porém, seis dos nove casos com P17 apresentaram também aumento de cópias de EGFR. É importante ressaltar que, nesses seis casos, cinco tinham o aumento de cópias devido à polissomia do cromossomo 7, e não a amplificação de EGFR, como ilustra a Figura 15.

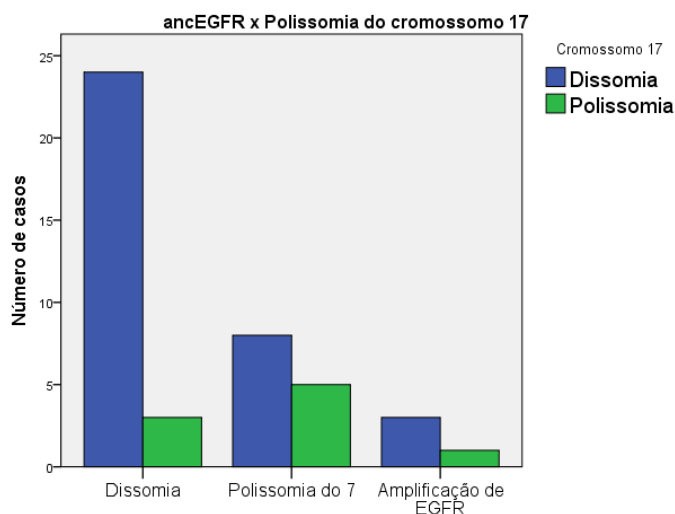


Figura 15 - Distribuição dos casos de carcinoma peniano com P17 apresentando dissomia do cromossomo 7, polissomia do cromossomo 7 ou amplificação de *EGFR*.

4.5.3 Expressão de TOP2a e associações com variáveis clínicas e patológicas

A expressão de TOP2a se associou significativamente a presença de invasão vascular ou linfática ($p=0,024$), como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Associação entre a expressão de TOP2a por IHQ e dados clínicos e patológicos dos casos de carcinoma peniano.

Características	Expressão de TOP2a por IHQ		p
	Baixa	Alta (>30%)	
Estadio T			
T1	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0,867*
T2, T3 e T4	52 (70,3%)	22 (29,7%)	
Estadio N			
N0	34 (70,8%)	14 (29,2%)	>0,999**
N1-N2	26 (72,2%)	10 (27,8%)	
Infeção por HPV			
Ausente	29 (72,5%)	11 (27,5%)	0,440*
Presente	6 (60,0%)	4 (40,0%)	
Grau Histológico			
Baixo	11 (97,1%)	1 (8,3%)	0,165**
Intermediário ou Alto	49 (68,1%)	23 (31,9%)	
Invasão Vascular ou Linfática			
Ausente	47 (79,7%)	12 (20,3%)	0,024*
Presente	12 (54,5%)	10 (45,5%)	
Invasão Perineural			
Ausente	43 (74,1%)	15 (25,9%)	0,677*
Presente	16 (69,6%)	7 (30,4%)	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Ausente	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0,669**
Presente	45 (73,8%)	16 (26,2%)	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Ausente	20 (80,0%)	5 (20,0%)	0,184**
Presente	28 (63,6%)	16 (36,4%)	
Infiltração da Uretra			
Ausente	28 (73,7%)	10 (26,3%)	0,625*
Presente	17 (68,0%)	8 (32,0%)	
Padrão de Crescimento			
Exofítico	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0,096**
Infiltrativo	46 (67,6%)	22 (32,4%)	
Recidiva da doença			
Ausente	45 (69,2%)	20 (30,8%)	0,781**
Presente	15 (75,0%)	5 (25,0%)	
Expressão de HER2			
Negativa	53 (72,6%)	20 (27,4%)	0,315*
Citoplasmática	7 (58,3%)	5 (41,7%)	
Número de cópias de EGFR			
Dissomia	11 (68,8%)	5 (31,2%)	0,926*
Aumento de cópias	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Cromossomo 17			
Dissomia	9 (60,0%)	6 (40,0%)	>0,999**
Polissomia	1 (100,0%)	0 (0,0%)	

* Teste do Chi-quadrado de Pearson / ** Teste Exato de Fisher

4.6 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DOS LINFONODOS (LN)

4.6.1 Comprometimento de LN e variáveis clínicas e patológicas

Os dados clínico-patológicos foram associados à presença de metástase nos linfonodos após avaliação patológica (Tabela 7). Houve associação significativa entre a variável e invasão perineural ($p < 0,001$), estágio clínico N ($p = 0,002$) e mais alto grau histológico ($p = 0,003$).

Tabela 7 - Associação entre presença de metástases nos linfonodos e dados clínicos e patológicos dos casos de carcinoma peniano.

Características	Metástases em linfonodos		p
	Ausente	Presente	
Estadio T			
T1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0,292**
T2, T3 e T4	20 (37,7%)	33 (62,3%)	
Estadio N			
N0	13 (72,2%)	5 (27,8%)	0,002**
N1-N2	10 (26,3%)	28 (73,7%)	
Infecção por HPV			
Ausente	8 (38,1%)	13 (61,9%)	0,919*
Presente	4 (40,0%)	6 (60,0%)	
Grau Histológico			
Baixo	6 (100,0%)	0 (0,0%)	0,003**
Intermediário ou Alto	17 (33,3%)	34 (66,7%)	
Invasão Vascular ou Linfática			
Ausente	19 (48,7%)	20 (51,3%)	0,083**
Presente	4 (22,2%)	14 (77,8%)	
Invasão Perineural			
Ausente	18 (64,3%)	10 (35,7%)	<0,001** **
Presente	5 (17,2%)	24 (82,8%)	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Ausente	1 (25,0%)	3 (75,0%)	0,630**
Presente	20 (43,5%)	26 (56,5%)	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Ausente	8 (50,0%)	8 (50,0%)	0,286*
Presente	12 (34,3%)	23 (65,7%)	
Infiltração da Uretra			
Ausente	11 (50,0%)	11 (50,0%)	0,130**
Presente	6 (26,1%)	17 (73,9%)	
Padrão de Crescimento			
Exofítico	4 (40,0%)	6 (60,0%)	>0,999*
Infiltrativo	18 (40,0%)	27 (60,0%)	
Recidiva da doença			
Ausente	22 (57,9%)	16 (42,1%)	<0,001**
Presente	1 (5,3%)	18 (94,7%)	

* Teste do Chi-quadrado de Pearson / ** Teste Exato de Fisher

4.6.2 Comprometimento de LN e variáveis moleculares

Dentre as variáveis moleculares estudadas, não foram observadas associações significativas com o risco de metástases em LN (Tabela 8).

Tabela 8 - Associação entre a presença de metástases nos linfonodos e variáveis moleculares nos casos de carcinoma peniano.

Características	Metástases em linfonodos		p
	Ausente	Presente	
Número de cópias de EGFR			
Dissomia	5 (33,3%)	10 (66,7%)	0,462**
Aumento de cópias	8 (53,7%)	7 (46,7%)	
Cromossomo 17			
Dissomia	10 (55,6%)	8 (44,4%)	0,084**
Polissomia	1 (12,5%)	7 (87,5%)	
Expressão de TOP2a			
Baixa	34 (56,7%)	26 (43,3%)	>0,999**
Alta	14 (58,3%)	10 (41,7%)	

* Teste do Chi-quadrado de Pearson / ** Teste Exato de Fisher

4.7 ANÁLISES DE SOBREVIDA

4.7.1 Sobrevida global

A sobrevida global dos pacientes portadores de carcinoma primário no pênis incluídos na presente série foi de 84,6% após dois anos do diagnóstico; 69,8% após cinco anos e 51,2% após 10 anos, como mostrado na Figura 16.

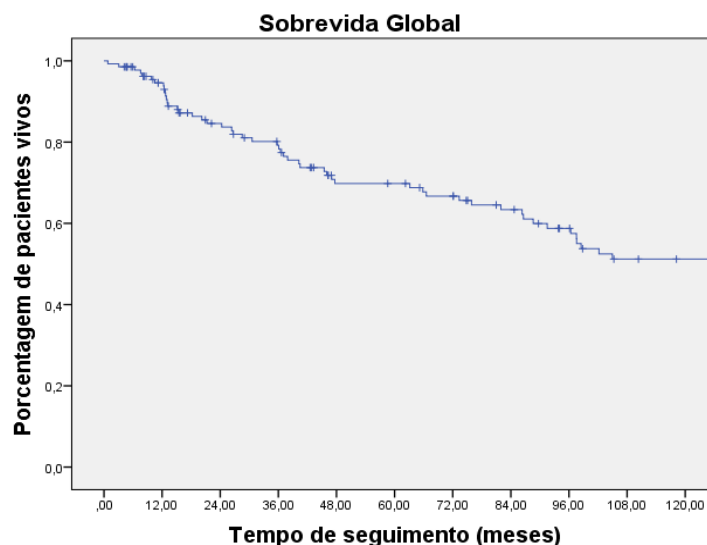


Figura 16 - Sobrevida global de pacientes com carcinoma peniano avaliados na presente série.

Pacientes maiores de 60 anos tiveram sobrevida global reduzida ($p=0,001$). As variáveis clínicas associadas com menor sobrevida global foram: recidiva da doença ($p<0,001$), estágio clínico N ($p=0,005$) e T ($p=0,019$). Dentre as variáveis patológicas associadas à sobrevida global estão: presença de invasão perineural ($p=0,001$), invasão de corpo cavernoso ($p=0,017$), de corpo esponjoso ($p=0,027$) e invasão vasculolinfática ($p=0,050$). O comprometimento de linfonodos no exame patológico não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,053$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Associação entre sobrevida global e variáveis clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano.

Características	Sobrevida Global		p
	5 anos	10 anos	
Estadio T			
T1	100,0%	83,3%	0,019
T2, T3 e T4	66,3%	47,8%	
Estadio N			
N0	77,3%	58,5%	0,005
N1-N2	60,1%	41,4%	
Idade			
Menor de 60 anos	77,3%	67,3%	0,001
Maior de 60 anos	59,5%	28,9%	
Infeção por HPV			
Ausente	52,4%	34,9%	0,386
Presente	68,1%	42,5%	
Grau Histológico			
Baixo	87,4%	75,3%	0,083
Intermediário ou Alto	64,6%	44,5%	
Invasão Vascular ou Linfática			
Ausente	75,0%	52,8%	0,050
Presente	48,2%	37,5%	
Invasão Perineural			
Ausente	78,4%	54,4%	0,001
Presente	46,7%	38,2%	
Infiltração do Corpo Esponioso			
Ausente	100,0%	100,0%	0,027
Presente	72,3%	52,8%	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Ausente	83,3%	68,9%	0,017
Presente	61,9%	42,6%	
Infiltração da Uretra			
Ausente	78,5%	62,5%	0,158
Presente	55,6%	42,4%	
Linfonodos comprometidos			
Não	68,8%	40,1%	0,053
Sim	41,6%	30,4%	
Padrão de Crescimento			
Exofítico	77,7%	44,6%	0,551
Infiltrativo	68,7%	52,6%	
Recidiva da doença			
Ausente	79,8%	57,7%	<0,001
Presente	33,3%	27,8%	

Das variáveis moleculares estudadas, a polissomia do cromossomo 17 (P17) e o aumento do número de cópias de *EGFR* (*ancEGFR*) apresentaram sobrevida global significativamente reduzida ($p=0,026$ e $p=0,046$, respectivamente), como pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10 - Associação entre sobrevida global e variáveis moleculares dos pacientes portadores de carcinoma peniano.

Características	Sobrevida Global		p
	5 anos	10 anos	
Número de cópias de EGFR			
Dissomia	78,7%	50,3%	0,046
Aumento de cópias	36,9%	29,5%	
Cromossomo 17			
Dissomia	83,3%	63,2%	0,026
Polissomia	35,0%	35,0%	
Expressão de TOP2a			
Baixa	77,5%	59,2%	0,100
Alta	64,1%	45,9%	

As curvas de sobrevida global com diferença estatisticamente significativa de acordo com variáveis clínicas e patológicas, podem ser vistas nas Figuras 1 e 2, respectivamente do Anexo 4. As curvas de sobrevida global de acordo com os achados moleculares se encontram na Figura 3 do Anexo 4.

4.7.2 Sobrevida câncer-específica

A sobrevida câncer específica (SCE) dos pacientes portadores de carcinoma primário no pênis incluídos na presente série foi de 88,7% após dois anos do diagnóstico; 83,7% após cinco anos e 80,6% após 10 anos, como pode ser visto na Figura 17.

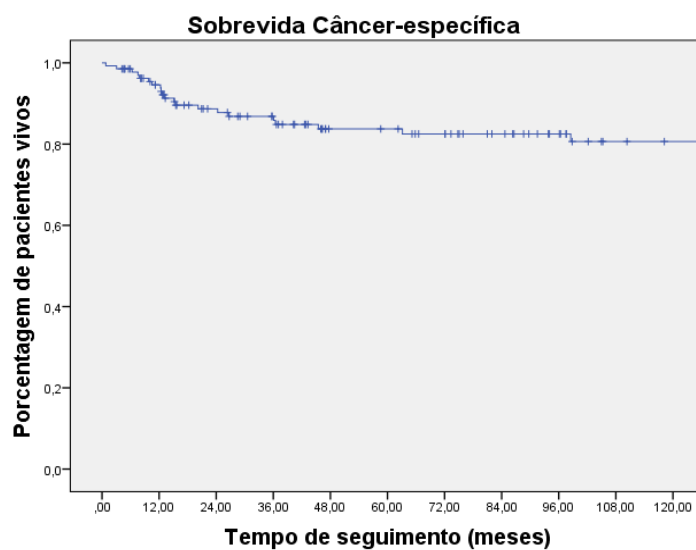


Figura 17 - Sobrevida câncer-específica de pacientes com carcinoma peniano avaliados na presente série.

Dentre as variáveis clínicas, estiveram associadas a menor SCE a ocorrência de recidivas ($p < 0,001$) e estágio clínico N ($p = 0,022$). Dentre as patológicas, invasão perineural ($p = 0,001$), presença de linfonodos comprometidos no exame patológico ($p = 0,021$) e grau histológico de intermediário a alto ($p = 0,033$). A diferença de sobrevivida entre pacientes com e sem invasão vasculo-linfática não atingiu significância estatística ($p = 0,100$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Associação entre sobrevida câncer-específica e variáveis clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano.

Características	Sobrevida Câncer-específica		p
	5 anos	10 anos	
Estadio T			
T1	100,0%	100,0%	0,081
T2, T3 e T4	81,7%	78,2%	
Estadio N			
N0	90,8%	88,0%	0,022
N1-N2	75,1%	71,7%	
Idade			
Menor de 60 anos	82,7%	80,8%	0,519
Maior de 60 anos	85,4%	77,6%	
Infecção por HPV			
Ausente	73,3%	73,3%	0,743
Presente	80,7%	76,4%	
Grau Histológico			
Baixo	96,4%	96,4%	0,033
Intermediário ou Alto	79,8%	75,7%	
Invasão Vascular ou Linfática			
Ausente	87,7%	86,1%	0,100
Presente	70,4%	70,4%	
Invasão Perineural			
Ausente	92,9%	88,3%	0,001
Presente	60,7%	60,7%	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Ausente	100,0%	100,0%	0,132
Presente	83,8%	79,8%	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Ausente	85,5%	85,5%	0,529
Presente	81,3%	78,4%	
Infiltração da Uretra			
Ausente	84,7%	84,7%	0,372
Presente	74,0%	74,0%	
Linfonodos comprometidos			
Não	83,4%	83,4%	0,021
Sim	54,5%	47,7%	
Padrão de Crescimento			
Exofítico	85,8%	70,9%	0,546
Infiltrativo	84,6%	84,6%	
Recidiva da doença			
Ausente	94,6%	93,1%	<0,001
Presente	42,1%	35,1%	

Das variáveis moleculares estudadas, *ancEGFR* e P17 apresentaram SCE significativamente reduzida ($p=0,005$ e $p=0,015$, respectivamente), conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Associação entre sobrevida câncer-específica e variáveis moleculares dos pacientes portadores de carcinoma peniano.

	Sobrevida Câncer-específica		p
Características	5 anos	10 anos	
Número de cópias de <i>EGFR</i>			
Dissomia	93,5%	89,5%	0,005
Aumento de cópias	55,3%	55,3%	
Cromossomo 17			
Dissomia	91,2%	91,2%	0,001
Polissomia	39,4%	39,4%	
Expressão de TOP2a			
Baixa	89,6%	86,4%	0,314
Alta	81,7%	76,6%	

As curvas de sobrevida câncer-específica das variáveis clínicas e patológicas com diferença significativa e das variáveis moleculares podem ser vistas nas Figuras 1 e 2 do Anexo 5.

4.7.3 Sobrevida Livre de Recidiva

A sobrevida livre de recidiva (SLR) dos pacientes portadores de carcinoma primário no pênis incluídos na presente série foi de 80,7% após um ano do diagnóstico; 77,5% após dois anos e 73,8% após 5 anos, como pode ser visto na Figura 18.

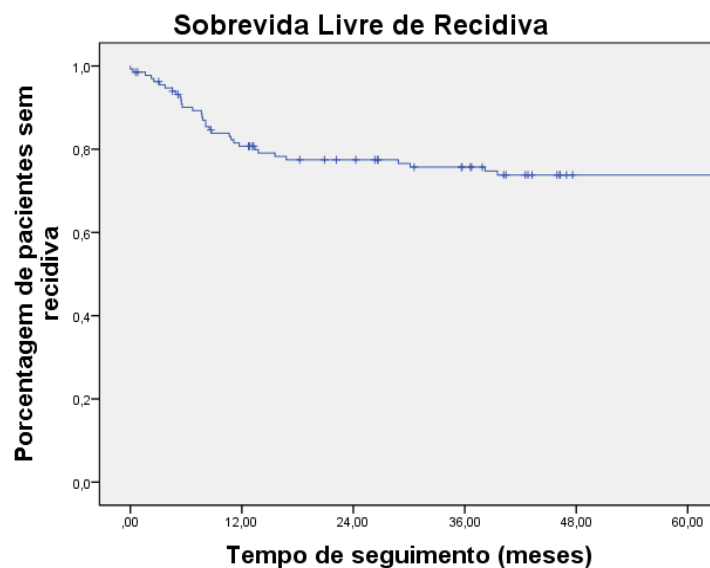


Figura 18 - Sobrevida livre de recidiva de pacientes com carcinoma peniano avaliados na presente série.

Dentre as variáveis clínicas, estiveram associadas a menor SLR foram: estágio clínico N ($p=0,011$) e T ($p=0,034$). Dentre as patológicas, presença de linfonodos comprometidos no exame patológico ($p<0,001$), invasão perineural ($p<0,001$), grau histológico de intermediário a alto ($p=0,005$) e infiltração de uretra ($p=0,006$). A diferença de sobrevida entre pacientes com e sem invasão vasculo-linfática não atingiu significância estatística ($p=0,055$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação entre sobrevida livre de recidiva e variáveis clínicas e patológicas dos pacientes portadores de carcinoma peniano.

Características	Sobrevida Livre de Recidiva		p
	1 ano	5 anos	
Estadio T			
T1	100,0%	100,0%	0,034
T2, T3 e T4	78,5%	70,7%	
Estadio N			
N0	88,6%	82,5%	0,011
N1-N2	70,0%	63,7%	
Idade			
Menor de 60 anos	75,5%	70,0%	0,143
Maior de 60 anos	89,5%	80,1%	
Infecção por HPV			
Ausente	64,2%	64,2%	0,511
Presente	78,0%	71,6%	
Grau Histológico			
Baixo	96,3%	96,3%	0,005
Intermediário ou Alto	76,4%	67,4%	
Invasão Vascular ou Linfática			
Ausente	83,5%	76,6%	0,055
Presente	66,9%	58,8%	
Invasão Perineural			
Ausente	88,6%	85,1%	<0,001
Presente	59,5%	42,2%	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Ausente	90,9%	90,9%	0,184
Presente	79,1%	72,4%	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Ausente	88,6%	81,3%	0,107
Presente	74,4%	67,7%	
Infiltração da Uretra			
Ausente	89,5%	82,0%	0,006
Presente	65,9%	53,4%	
Linfonodos comprometidos			
Não	100,0%	93,3%	<0,001
Sim	53,5%	41,2%	
Padrão de Crescimento			
Exofítico	79,3%	71,6%	0,879
Infiltrativo	79,5%	73,6%	

Das variáveis moleculares estudadas, P17 apresentou SLR significativamente reduzida ($p < 0,001$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Associação entre sobrevida livre de recidiva e variáveis moleculares dos pacientes portadores de carcinoma peniano.

	Sobrevida Livre de Recidiva		p
Características	1 ano	5 anos	
Número de cópias de EGFR			
Dissomia	82,5%	77,8%	0,460
Aumento de cópias	75,2%	68,9%	
Cromossomo 17			
Dissomia	89,8%	87,6%	<0,001
Polissomia	66,7%	28,6%	
Expressão de TOP2a			
Baixa	83,8%	78,6%	0,779
Alta	81,4%	76,5%	

As curvas de sobrevida livre de recidiva das variáveis clínicas e patológicas com diferença significativa podem ser vistas nas figuras 1 e 2 do Anexo 6. As curvas de SLR das variáveis moleculares estão apresentadas na Figura 3 do Anexo 6.

4.8 ANÁLISES MULTIVARIADAS

4.8.1 Análise multivariada do comprometimento de linfonodos

As variáveis associadas com o risco de comprometimento dos linfonodos com valor de $p < 0,020$ foram incluídas na análise multivariada (Tabela 15).

Tabela 15 - Variáveis associadas com presença de metástases em linfonodos na análise univariada com valor de $p < 0,020$.

VARIÁVEIS	p
Invasão Perineural	<0,001
Estadio N clínico	0,002
Grau Histológico	0,003

A presença de invasão perineural (RR=9,650; IC 95% [(2,180–42,713)], e os estádios clínicos N1 e N2 (RR=5,879; IC 95% [(1,185–28,673)]) foram classificadas como fator de risco independente para a presença de metástases nos linfonodos na presente série (Tabela 16).

Tabela 16 - Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase nos linfonodos em pacientes portadores de carcinoma peniano.

VARIÁVEIS	RR	IC 95%	p
Invasão Perineural			
Ausente	1	Ref	0,003
Presente	9,650	2,180 – 42,713	
Estadio N clínico			
N0	1	Ref	0,030
N1 e N2	5,879	1,185 – 28,673	

4.8.2 Análise multivariada de sobrevida global

As variáveis associadas com sobrevida global que apresentaram valor de $p < 0,020$ foram incluídas na análise multivariada e estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Variáveis associadas com sobrevida global na análise univariada com valor de $p < 0,020$.

VARIÁVEIS	p
Recidiva	<0,001
Invasão Perineural	0,001
Idade acima de 60 anos	0,001
Estadio N clínico	0,005
Invasão de Corpo Cavernoso	0,017
Estadio T	0,019

No modelo multivariado de regressão de Cox, se mantiveram como fatores independentes para óbito as variáveis recidiva (RR=3,638; IC 95% [(1,909–6,935)], idade acima de 60 anos (RR=2,674; IC 95% [(1,501–4,766)]) e estágio clínico N (RR=1,815; IC 95% [(1,016–3,245)]) (Tabela 18).

Tabela 18 - Variáveis independentes associadas com a sobrevida global de pacientes portadores de carcinoma peniano.

VARIÁVEIS	RR	IC 95%	p
Recidiva			
Ausente	1	Ref	<0,001
Presente	3,638	1,909 – 6,935	
Idade			
Menos de 60 anos	1	Ref	0,001
Maior de 60 anos	2,674	1,501 – 4,766	
Estadio N clínico			
Negativo	1	Ref	0,044
Positivo	1,815	1,016 – 3,245	

4.8.3 Análise multivariada de sobrevida câncer-específica

As variáveis associadas com sobrevida câncer-específica que apresentaram valor de $p < 0,020$ foram incluídas na análise multivariada e estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Variáveis associadas com sobrevida câncer-específica na análise univariada com valor de $p < 0,020$.

VARIÁVEIS	p
Invasão Perineural	0,001
Polissomia do cromossomo 17	0,001
Aumento de cópias de <i>EGFR</i> (<i>ancEGFR</i>)	0,005

No modelo multivariado, a presença de invasão perineural foi fator de risco independente para óbito por câncer (RR=10,425; IC 95% [(1,192–91,156]; $p=0,011$), conforme Tabela 20.

Tabela 20 - Variável independente associada a sobrevida câncer-específica de pacientes portadores de carcinoma peniano.

VARIÁVEIS	RR	IC 95%	p
Invasão Perineural			
Ausente	1	Ref	0,034
Positiva	10,425	1,192 – 91,156	

O *ancEGFR* não foi um fator de risco independente para óbito por câncer, mas obteve um valor próximo à significância ($p=0,078$), conforme a Tabela 21.

Tabela 21 – Análise multivariada da associação entre *ancEGFR* e sobrevida câncer-específica de pacientes portadores de carcinoma peniano.

VARIÁVEIS	RR	IC 95%	p
<i>ancEGFR</i> *			
Dissomia	1	Ref	0,078
Ganho de cópias	7,038	0,802 – 61,759	

4.8.4 Análise multivariada de sobrevida livre de recidiva

As variáveis associadas com sobrevida livre de recidiva que apresentaram valor de $p < 0,020$ foram incluídas na análise multivariada e estão apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22 - Variáveis associadas com sobrevida livre de recidiva na análise univariada com valor de $p < 0,020$.

VARIÁVEIS	p
Linfonodos comprometidos no exame patológico	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Polissomia do cromossomo 17	<0,001
Grau Histológico	0,005
Infiltração de Uretra	0,006
Estadio N clínico	0,011

No modelo multivariado, apenas a presença de linfonodos positivos no exame patológico foi fator de risco independente para recidiva da doença (RR=4,814; IC 95% [(1,328–16,763), conforme Tabela 23.

Tabela 23 - Variável independente associada com a sobrevida livre de recidiva de pacientes portadores de carcinoma peniano.

VARIÁVEIS	RR	IC 95%	p
Linfonodos comprometidos			
Ausente	1	Ref	0,001
Presente	4,814	1,328 – 16,763	

5 DISCUSSÃO

O câncer de pênis (CP) é uma doença rara no mundo; porém, em certas regiões de países em desenvolvimento, como o Brasil, chega a ser um problema preocupante de saúde pública (FAVORITO et al. 2008; GUIMARÃES et al. 2011; CHAUX e CUBILLA 2012a). Apesar de o interesse pela doença ter crescido nas últimas décadas, não existem marcadores moleculares associados com o comportamento desses tumores ou que possam prever maior risco de recidivas ou óbito. E estes têm sido amplamente buscados (MUNEER et al. 2009; FICARRA et al. 2010; GUIMARÃES et al. 2011; SONPAVDE et al. 2013).

Nesta casuística encontramos uma forte associação entre progressão do CP e duas variáveis moleculares: aumento do número de cópias gênicas de *EGFR* (*ancEGFR*) e polissomia do cromossomo 17 (P17). Um pequeno aumento de cópias em relação à dissomia normal (de 3 a 6 cópias), encontrado em, aproximadamente, 32% e 19% dos casos estudados (*ancEGFR* e P17, respectivamente), mostrou uma forte e significativa associação com sobrevida reduzida.

EGFR tem sido reportado como um potencial alvo terapêutico no CP (MINHAS 2014), ainda que seu papel na carcinogênese peniana não seja claramente estabelecido. Os casos de doença avançada (estágio em que é mais frequentemente diagnosticada, dada a dificuldade de acesso à saúde pela população mais comumente afetada) contam com poucas opções de terapias; a maioria delas sendo regimes de quimioterapia baseados em

platina, com alta taxa de toxicidade e baixa taxa de resposta (FAVORITO et al. 2008; GUIMARÃES et al. 2011; KOIFMAN et al. 2011; CHAUX e CUBILLA 2012a). Neste contexto, a busca dessas novas terapias se fortalece.

Na presente série, pudemos observar amplificação de *EGFR* em doze casos (<9%), sendo que cinco deles apresentaram ganhos entre 3 e 6 cópias do gene, e apenas um caso com amplificação em *cluster*, com mais de 15 sinais do gene. Observamos ainda polissomia do cromossomo 7 em quase um quarto da amostra (23,5%). O número de cópias gênicas de *EGFR* foi avaliado previamente no CP em uma casuística de 144 casos incluídos em TMA, e não foram encontrados *clusters* de amplificação do gene, mas sim ganhos – mostrados como três sinais do gene em relação a dois do centrômero do cromossomo 7 – em 14% dos casos, sem associação com prognóstico (STANKIEWICZ et al. 2011).

As curvas de sobrevida câncer-específica dos pacientes apresentando tanto amplificação/ganhos de *EGFR* quanto polissomia do cromossomo 7 se mostraram semelhantes, significativamente reduzidas em comparação com a de pacientes sem alterações de número de cópias. Esses dois fenômenos, embora distintos biologicamente, causam aumento do número de cópias de *EGFR*. É possível que, nos casos de polissomia do cromossomo 7, a associação com mau prognóstico se deva também a uma instabilidade cromossômica, e não apenas a uma ação direta de *EGFR*. Mas, pelo impacto semelhante na sobrevida, esses casos foram chamados de casos com aumento do número de cópias de *EGFR* (*ancEGFR*).

Apenas um caso com anc*EGFR* era de baixo grau histológico. Dez casos apresentaram grau intermediário e onze casos, alto grau. Grau histológico, juntamente com embolização linfática e invasão perineural, é uma das mais importantes variáveis patológicas associadas à disseminação por linfonodos e mortalidade no CP (CUBILLA 2009).

Assim como STANKIEWICZ et al. (2011), não observamos associação entre essas alterações no número de cópias gênicas e aumento de expressão por imuno-histoquímica (IHQ). Em outros tumores, essa associação também é controversa (CHUNG et al. 2006; RYOTT et al. 2009; CAMPANELLA et al. 2010; ISAKSSON et al. 2013). Apesar da ausência de significância estatística, cinco dos seis casos com amplificação/ganhos de *EGFR* apresentaram marcação forte e completa de membrana na IHQ. Dos casos com polissomia do cromossomo 7, a maioria (12/16) também apresentou o mesmo padrão de marcação. Dos casos negativos na IHQ, nenhum apresentou alterações no número de cópias.

Em trabalho anterior de nosso grupo (SILVA 2010), a expressão imuno-histoquímica de *EGFR* se mostrou associada com ocorrência de recidivas e presença de metástases nos linfonodos (LN). Este ainda é um dado inédito na literatura internacional, que reporta expressão em universalmente todos os casos (LAVENS et al. 2010; GOU et al. 2013). CHAUX et al. (2013) foram os primeiros a ressaltar diferença no padrão e intensidade de expressão, classificando o grau de intensidade e completude de marcação de membrana. Os autores observaram alta expressão em 44% dos 112 casos avaliados em microarranjos de tecido (TMA, do inglês, *tissue*

microarrays), e 12% dos casos negativos para o marcador, sem associação entre marcação e prognóstico (CHAUX et al. 2013).

O critério de avaliação dos achados de imuno-histoquímica para EGFR difere entre os estudos, o que dificulta a comparação de resultados. Além disto, é sabido que a expressão de EGFR é heterogênea (DE MELO MAIA et al. 2014), o que pode comprometer a avaliação através de TMA. Levando-se em consideração que a resposta a terapias alvo pode variar de acordo com essas características tumorais, é importante que esses critérios sejam uniformizados.

O *ancEGFR* também separou significativamente as curvas de sobrevida global e, mais interessante, câncer específica ($p=0,046$ e $p=0,005$, respectivamente). Após cinco anos de seguimento, menos de 7% dos pacientes sem alterações no número de cópias genicas de *EGFR* foram a óbito pela doença. No grupo com *ancEGFR*, a mortalidade pelo câncer foi mais de seis vezes superior, alcançando 44,7%.

Apesar dessas importantes associações, o *ancEGFR* não foi, nesta casuística, um fator de risco independente de óbito por câncer (apenas a presença de invasão perineural o foi, e será discutido posteriormente). Mas deve-se considerar que houve um valor de p próximo à significância ($p=0,076$), com risco relativo de óbito por câncer sete vezes superior para pacientes com aumento do número de cópias gênicas, caso a relação fosse verdadeira ($p<0,05$). Novos estudos são importantes para determinar de forma mais definitiva esta relação prognóstica.

Em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, o mesmo evento foi observado e o *ancEGFR*, independentemente do mecanismo

causador (ganhos/amplificação do gene ou polissomia do cromossomo 7), é um indicador de mau prognóstico (CHUNG et al. 2006). Em carcinoma de pulmão, o *ancEGFR* é um indicativo de resposta a terapia com anticorpos monoclonais (CAPPUZZO et al. 2005).

O papel do *ancEGFR* na predição de resposta a terapia alvo para o CP ainda precisa ser investigado. Frente à relevância deste marcador no prognóstico, demonstrada neste estudo, é pertinente que esta análise seja incluída em ensaios clínicos futuros que avaliem resposta às estas terapias.

Ainda do ponto de vista de predição de resposta à terapia, em carcinoma de pulmão, a presença de mutações ativadoras no domínio TK (éxons 18 a 21) de EGFR também é um marcador importante (CAPPUZZO et al. 2005; SCALTRITI e BASELGA 2006; CAPPUZZO 2008). Neste estudo observamos ausência de mutações nos quatro éxons codificadores do domínio TK de EGFR (éxons 18 a 21) através do sequenciamento de 29 amostras congeladas. Esses resultados foram publicados (SILVA et al. 2013), sendo a primeira avaliação dessas alterações por sequenciamento em CP. Foi encontrado apenas, na maioria dos casos (19/29) um polimorfismo de base única (SNP) no éxon 20, o p.Q787Q, uma alteração silenciosa que não implica na modificação de aminoácido da cadeia proteica. Esse SNP é frequentemente encontrado em casos de carcinoma de células escamosas da cavidade oral e de pulmão, sem associação com sobrevida (HSIEH et al. 2011; JIA e CHEN 2011).

Nosso resultado de ausência de mutação corroborou com os achados de DI LORENZO et al. (2013), que reportaram ausência de duas alterações específicas em dois desses éxons (a deleção A746-E750, no éxon 19; e a

mutação pontual L858R, no éxon 21) através de imuno-histoquímica em 30 casos avaliados em TMA.

Ainda em concordância esses dados, encontramos um total de 104 pacientes com CP negativos para estas duas alterações, através de imuno-histoquímica. É a primeira análise de uma casuística maior de CP para estas alterações. Esses dados mostram que, para esta neoplasia, mutações no domínio codificador da atividade TK de EGFR não parecem ser relevantes para o prognóstico e nem explicam a frequente expressão do receptor nesses tumores. É possível, entretanto, que alterações em outras regiões gênicas possam revelar algum valor prognóstico ou preditivo de terapia alvo.

Essas mutações ativadoras do domínio TK parecem estar mais associadas a adenocarcinomas do que a carcinomas de células escamosas; enquanto o segundo tipo histológico apresenta mais frequentemente superexpressão da proteína e amplificação ou ganhos do gene (ISAKSSON et al. 2013).

A presença de mutação dos domínios TK é hoje a critério de indicação de terapia alvo com inibidores da atividade de EGFR a pacientes com carcinoma de pulmão (ROSELL et al. 2006a; KEEDY et al. 2011). Porém, a análise de número de cópias gênicas por FISH consegue estratificar pacientes que têm um ganho de sobrevida e, para pacientes com doença metastática, onde a cura definitiva não é mais possível, a análise de cópias gênicas pode trazer benefícios (CAPPUZZO 2008). Portanto, em futuros estudos que avaliem a eficácia de terapias alvo anti-EGFR, tanto com anticorpos monoclonais quanto com inibidores do domínio TK, é

importante a inclusão da análise de número de cópias gênicas de *EGFR* como marcador para seleção de pacientes.

O segundo marcador com impacto prognóstico importante identificado na presente pesquisa foi a polissomia do cromossomo 17 (P17). A análise do número de cópias de *HER2* e *TOP2a* não mostrou amplificações ou ganhos desses genes, mas sim P17 em doze dos 52 casos avaliados. É importante lembrar que outros genes com papel no controle do crescimento e resistência à apoptose, como *TP53*, *BRCA1* e survivina, são codificados neste mesmo cromossomo. Em cinco dos casos com P17, foi encontrada também polissomia do cromossomo 7. Nesses casos, é possível que exista, nesses casos, uma importante instabilidade cromossômica ou aneuploidia que favoreça o surgimento de novas alterações que conferem vantagem no crescimento descontrolado das células tumorais.

Os casos com polissomia do cromossomo 17 (P17) apresentaram mais recidivas (7/13) do que casos sem a alteração (5/49). Em conformidade com este dado, encontramos uma forte associação com sobrevida livre de recidivas reduzida ($p < 0,001$). A maioria das recidivas ocorreu dentro dos primeiros 12 meses após o diagnóstico (25/35). Nesse período, 10,2% dos pacientes com dissomia do cromossomo 17 apresentaram recidiva, um terço do ocorrido em pacientes com P17 (33,3%). Curiosamente, a maior diferença foi observada após cinco anos: enquanto 17,5% do grupo com dissomia do cromossomo 17 apresentou recidivas – percentual próximo ao observado dentro de 12 meses – e, nos pacientes com P17, essa taxa subiu para 75%. É possível que a P17 favoreça o surgimento de outras alterações

moleculares que aumentem o potencial invasor das células tumorais, propiciando o aparecimento de recidivas mesmo em momentos mais tardios.

Houve ainda associação entre P17 e sobrevidas global e câncer-específica reduzidas ($p=0,037$ e $p=0,015$, respectivamente). Em cinco anos, a mortalidade por câncer no grupo com dissomia do cromossomo 17 foi de 12,4%, enquanto no grupo com polissomia a mortalidade foi superior a 70%, com apenas 28,6% dos pacientes vivos. Entretanto, é importante ressaltar também o pequeno número de casos com P17 (doze casos).

Em adenocarcinomas gástricos, foi observada P17 em cerca de 16% dos casos, enquanto a amplificação de HER2 e TOP2a foi mais rara (3%); e sem associação prognóstica (LIANG et al. 2008). Mais recentemente, P17 foi associada a maior risco de metástases a distância, sem associação com expressão proteica de TOP2a ou HER2 (CIESIELSKI et al. 2014). Em sarcomas, a P17 foi infrequente (2 casos de 72 avaliados), enquanto a amplificação de *TOP2a* e *HER2* foi mais comumente encontrada (9/72), mas sem associação com níveis de expressão proteica ou sobrevida (CUNHA et al. 2012).

A avaliação de número de cópias de *HER2* e *TOP2a* é extensa em tumores de mama, dada sua importância na decisão terapêutica. Em geral, os dois genes estão co-amplificados e associados a prognóstico desfavorável (LAMY et al. 2011; FASCHING et al. 2014). Alguns autores argumentam, entretanto, que o aumento de cópias do centrômero do cromossomo 17 (CEP17) visto por FISH não significa uma polissomia verdadeira. Avaliações simultâneas de outros genes do cromossomo 17 como *RARA*, *SMS* e *TP53* demonstram que, na maioria das vezes, a região

centromérica encontra-se amplificada, sendo a polissomia um evento extremamente raro (TSE et al. 2011; HANNA et al. 2014). Ainda assim, esses ganhos no cromossomo 17 estão associados alto grau nuclear e histológico, maior atividade mitótica e doença avançada, mesmo em casos HER2 negativos na IHQ e sem a amplificação do gene por FISH, indicando maior potencial de malignidade (HYUN et al. 2008; VANDEN BEMPT et al. 2008; TSE et al. 2011; FOUNTZILAS et al. 2013; ORSARIA et al. 2013; JIANG et al. 2014). No CP, por causa da frequência de polissomia do cromossomo 7 (23,5%), é possível que exista um desbalanço genômico ou aneuploidia que explique este fenômeno. Todavia, novos estudos são necessários para que este ponto seja esclarecido.

Não houve associação entre P17 e a expressão de duas proteínas codificadas no braço longo do cromossomo 17, o receptor HER2, avaliado previamente (SILVA 2010), e o marcador de proliferação topoisomerase II α (TOP2a). Isto também corrobora a ideia de que a instabilidade cromossômica, mais do que a ação direta dos produtos gênicos ali contidos, desempenhe um papel relevante na progressão da doença.

A expressão de TOP2a foi associada a prognóstico desfavorável em sarcomas (CUNHA et al. 2012), semelhante ao reportado para tumores de mama (BRASE et al. 2010; ROMERO et al. 2011). No CP, marcadores de proliferação têm papel ainda não estabelecido. Um estudo de nosso grupo incluindo 125 dos casos aqui avaliados encontrou associação inversa entre expressão de Ki-67 e risco de metástases em LN: casos com mais de 10% de células marcadas para Ki-67 apresentavam significativamente menor comprometimento de LN. Essa associação se manteve em análise

multivariada (GUIMARÃES et al. 2007). Em contrapartida, a expressão deste marcador já foi associada a tumores de mais alto grau histológico (BERDJIS et al. 2005; BERNEY et al. 2008; STANKIEWICZ et al. 2012) e maior frequência de comprometimento de LN (PROTZEL et al. 2007; ZHU et al. 2007). Ausência de associações significativas com maior risco de metástases nos LN foi reportada (BERDJIS et al. 2005; STANKIEWICZ et al. 2012).

Nos casos de mais alto grau histológico associados à expressão de TOP2a, a média de núcleos positivos em casos de baixo grau foi de 30%; comparado com a média de 10% em casos de baixo grau (BERNEY et al. 2008). Na presente casuística, utilizando o mesmo *cutoff* (30% de núcleos marcados), a expressão de TOP2a não mostrou associação com grau histológico, apesar de apenas um caso de baixo grau ser positivo. Porém, houve maior taxa de invasão vascular ou linfática ($p=0,024$), também uma característica prognóstica importante para CP (LOPES et al. 1996). As curvas de sobrevida global e câncer-específicas foram diferentes nos grupos positivo e negativo, mas não atingiram significância estatística. O papel de marcadores de proliferação no CP ainda precisa de investigações adicionais a fim de se determinar seu papel prognóstico.

Do ponto de vista epidemiológico, o CP acomete adultos, em geral, a partir da sexta ou sétima década de vida (CHAUX e CUBILLA 2012a). Em alguns países, a idade de aparecimento da doença também é um pouco mais precoce (FAVORITO et al. 2008). Em acordo com este dado, a idade média de idade dos pacientes incluídos nesta casuística foi de 55,3 anos, e

moda de 50 anos; sendo o paciente mais jovem acometido aos 21 anos de idade.

Nenhuma das variáveis moleculares consideradas neste estudo foi associada ao maior risco de comprometimento de linfonodos. Nos casos com P17, entretanto, a maioria dos casos com polissomia (7/8) apresentaram metástases nos LN, em comparação com 8 dos 18 casos com dissomia do cromossomo 17. Do ponto de vista estatístico, apenas características patológicas e clínicas já reportadas na literatura mostraram associação significativa com esta importante variável prognóstica. Dentre elas, a presença de invasão perineural foi a mais fortemente associada ($p < 0,001$), conforme já descrito anteriormente (VELAZQUEZ et al. 2008; CHAUX et al. 2009; CHAUX e CUBILLA 2012b).

O comprometimento de LN no exame clínico e grau histológico de intermediário a alto também foram associados a maior risco de desenvolvimento de metástases nos LN, sendo que nenhum tumor de baixo grau apresentou comprometimento, em acordo com a literatura (VELAZQUEZ et al. 2008). Entretanto, dez casos avaliados como N1 e N2 no exame clínico não tiveram o comprometimento confirmado no exame patológico. Da mesma forma, cinco casos avaliados como N0 acabaram desenvolvendo metástases nos linfonodos. Apesar de novas estratégias propostas para reavaliações do comprometimento de LN após uso de antibióticos terem reduzido as taxas de falsos positivos (GUIMARÃES et al. 2011), novos critérios mais acurados ainda precisam ser pesquisados.

A despeito disto, invasão do espaço perineural e estadiamento clínico N foram fatores de risco independentes para o surgimento de metástases

nos LN, com risco 9 vezes e 5 vezes superior para a presença de invasão perineural e estágio clínico N1 ou N2, respectivamente.

Como fatores de risco independente para óbito e óbito por câncer, foram observadas apenas variáveis clínicas e patológicas já previamente associadas ao prognóstico de CP. A análise de sobrevida global apresentou ocorrência de recidiva, idade avançada e estágio N clínico como fatores de risco independentes. Na análise da sobrevida câncer-específica, a presença de invasão perineural foi o único fator independente para óbito por câncer, e sua importância para a doença já é bem estabelecida na literatura (VELAZQUEZ et al. 2008; CUBILLA 2009; GUIMARÃES et al. 2009; CHAUX e CUBILLA 2012b).

Esses resultados indicam um avanço no entendimento na biologia da carcinogênese peniana, já que uma importante associação foi observada para alguns dos marcadores avaliados. Marcadores que consigam melhor selecionar pacientes com maior risco de metástases nos linfonodos, entretanto, ainda precisam ser pesquisados.

6 CONCLUSÕES

Através do presente estudo, foi possível observar que:

- 1 O aumento do número de cópias gênicas de EGFR é um evento raro em carcinoma peniano (CP), mas com impacto significativo na sobrevida dos pacientes;
- 2 Independente do mecanismo causador do aumento do número de cópias gênicas de EGFR (seja por polissomia do cromossomo 7 ou por ganhos ou amplificação de EGFR), esse aumento, ainda que pequeno em número de cópias, parece ter papel importante na progressão da carcinogênese peniana, já que foi associada a maior risco de óbito por câncer;
- 3 Mutações nos éxons codificadores do domínio tirosina-cinase de EGFR não foram encontradas nas amostras de CP, tanto avaliadas por sequenciamento nos éxons 18, 19, 20 e 21; quanto duas alterações específicas avaliadas por imuno-histoquímica: a deleção A746-E750, localizada no éxon 19; e a mutação pontual L858R, no éxon 21. Esses achados sugerem que essas alterações não sejam frequentes nesta neoplasia. Entretanto, é possível que existam alterações em outras regiões do gene que sejam indicativas de prognóstico ou de resposta a terapia alvo;

- 4 Amplificação de HER2 ou de TOP2a não foram observadas nesta série, mas a polissomia cromossomo 17, embora infrequente, está associada a menor sobrevida global, câncer específica e livre de recidiva;
- 5 A expressão do marcador de proliferação topoisomerase II α (TOP2a) está associada a invasão vascular ou linfática, que é uma importante variável patológica de prognóstico, mas não a sobrevida de pacientes portadores de carcinoma peniano (CP);

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez G, Perry A, Tan BR, Wang HL. Expression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinomas of the anal canal is independent of gene amplification. **Mod Pathol** 2006; 19:942-9.

Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. **EMBO J** 2006; 25:3234-44.

Antunes AA, Dall'Oglio MF, Srougi M. Organ-sparing treatment for penile cancer. **Nat Clin Pract Urol** 2007;4(11):596-604.

Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. **Cancer Res** 2011; 71:1515-9.

Baiocchi G, Lopes A, Coudry RA, et al. ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. **Int J Colorectal Dis** 2009; 24:1059-68.

Baker SJ, Reddy EP. Targeted inhibition of kinases in cancer therapy. **Mt Sinai J Med** 2010; 77:573-86.

Barski D, Georgas E, Gerullis H, Ecke T. Metastatic penile carcinoma - an update on the current diagnosis and treatment options. **Eur J Urol** 2014; 67:126-32.

Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. **J Clin Oncol** 2011; 9:3030-6.

Berdjjs N, Meye A, Nippgen J, et al. Expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. **BJU Int** 2005; 96:146-8.

Berney DM, Stankiewicz E, Adlan AM, et al. DNA topoisomerase I and Halpha expression in penile carcinomas: assessing potential tumour chemosensitivity. **BJU Int** 2008; 102:1040-4.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001; 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.

Boeckx C, Weyn C, Vanden Bempt I, et al. Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response. **BMC Res Notes** 2014; 7:337.

Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, et al. ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2391-401.

Brown A, Ma Y, Danenberg K, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in squamous cell carcinoma of the penis: a report of 3 cases. **Urology** 2014; 83:159-65.

Campanella C, Mottolese M, Cianiulli A, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number in 101 advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy plus cetuximab. **J Transl Med** 2010; 8:36.

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

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:643-55.

Cappuzzo F. Should every lung cancer patient be tested for EGFR mutation? **Expert Opin Ther Targets** 2006; 10:789-91.

Cappuzzo F, Ligorio C, Toschi L, et al. EGFR and HER2 gene copy number and response to first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **J Thorac Oncol** 2007; 2:423-9.

Cappuzzo F. EGFR FISH versus mutation: different tests, different endpoints. **Lung Cancer** 2008; 60:160-5.

Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:143-8.

Carthon BC, Ng CS, Pettaway CA, Pagliaro LC. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the penis. **BJU Int** 2014; 113:871-7.

Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu Rev Biochem** 2001; 70:369-413.

Chandarlapaty S, Scaltriti M, Angelini P, et al. Inhibitors of HSP90 block p95-HER2 signaling in Trastuzumab-resistant tumors and suppress their growth. **Oncogene** 2010; 29:325-34.

Chaux A, Caballero C, Soares F, 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** 2009; 33:1049-57.

Chaux A, Lezcano C, Cubilla AL, Tamboli P, Ro J, Ayala A. Comparison of subtypes of penile squamous cell carcinoma from high and low incidence geographical regions. **Int J Surg Pathol** 2010a; 18:268-77.

Chaux A, Tamboli P, Ayala A, et al. Warty-basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm Report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010b; 23:896-904.

Chaux A, Cubilla AL. Advances in the pathology of penile carcinomas. **Hum Pathol** 2012a; 43:771-89.

Chaux A, Cubilla AL. Stratification systems as prognostic tools for defining risk of lymph node metastasis in penile squamous cell carcinomas. **Semin Diagn Pathol** 2012b; 29:83-9.

Chaux A, Munari E, Katz B, et al. The epidermal growth factor receptor is frequently overexpressed in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray and digital image analysis study of 112 cases. **Hum Pathol** 2013; 44:2690-5.

Chung CH, Ely K, McGavran L, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. **J Clin Oncol** 2006; 24:4170-6.

Ciesielski M, Kruszewski WJ, Smialek U, et al. The HER2 Gene and HER2 Protein Status and Chromosome 17 Polysomy in Gastric Cancer Cells in Own Material. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2014; [Epub ahead of print].

Corbishley CM. Should centralized histopathological review in penile cancer be the global standard? A call for the international adoption of penile specialist networks. **BJU Int** 2014; 114:317-8.

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

Cui Y, Chang D, Liu M, et al. Identification of exon 19 and 21 mutations of EGFR gene in Chinese patients with esophageal squamous cell carcinoma. **World J Surg Oncol** 2013; 11:266.

Cunha IW, Guimaraes GC, Soares F, 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.

Cunha IW, De Brot L, Carvalho KC, et al. Prognostication of soft tissue sarcomas based on chromosome 17q gene and protein status: evaluation of TOP2A, HER-2/neu, and survivin. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:1790-9.

Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Kosmidis P, Bafaloukos D, Murray S. Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:291-303.

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

De Melo Maia B, Fontes AM, Lavorato-Rocha AM, et al. EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity. **Hum Pathol** 2014; 45:917-25.

Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, Piette F, et al. HER2/TOP2A Meta-analysis Study Group. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. **Lancet Oncol** 2011; 12:1134-42.

Di Lorenzo G, Buonerba C, Gaudioso G, et al. EGFR mutational status in penile cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2013; 17:501-5.

Djajadiningrat RS, Jordanova ES, Kroon BK, et al. Human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer and association with clinical outcome. **J Urol** 2014; [Epub ahead of print].

Drenckhan A, Grob T, Dupree A, et al. Esophageal carcinoma cell line with high EGFR polysomy is responsive to gefitinib. **Langenbecks Arch Surg** 2014; 399:879-88.

Duffy MJ, O'Donovan N, Crown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treat Rev** 2011; 37:151-9.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Penis; p.447-56.

Engelstaedter V, Schiffers J, Kahlert S, et al. Her-2/neu and topoisomerase II α in advanced breast cancer: a comprehensive FISH analysis of 245 cases. **Diagn Mol Pathol** 2012; 21:77-83.

Engstrøm MJ, Ytterhus B, Vatten LJ, Opdahl S, Bofin AM. TOP2A gene copy number change in breast cancer. **J Clin Pathol** 2014; 67:420-5.

Fasching PA, Weihbrecht S, Haeberle L, et al. Press MF. HER2 and TOP2A amplification in a hospital-based cohort of breast cancer patients: associations with patient and tumor characteristics. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 145:193-203.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-91.

Ferrandiz-Pulido C, Masferrer E, Toll A, et al. mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and pelf4E over expression correlate with aggressive tumor behavior. **J Urol** 2013; 190:2288-95.

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, et al. Predictive pathological factors of lymph nodes involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. **Int Urol Nephrol** 2002; 34:245-50.

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; 175:1700-4.

Ficarra V, Novara G, Boscolo-Berto R, Artibani W, Kattan MW. How accurate are present risk group assignment tools in penile cancer?. **World J Urol** 2009; 27:155-60.

Ficarra V, Akduman B, Bouchot O, Palou J, Tobias-Machado M. Prognostic factors in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S66-73.

Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, et al. Evaluation of the prognostic role of centromere 17 gain and HER2/topoisomerase II alpha gene status and protein expression in patients with breast cancer treated with anthracycline-containing adjuvant chemotherapy: pooled analysis of two Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) phase III trials. **BMC Cancer** 2013; 13:163.

García-Castillo J, Pedersen K, Angelini PD, et al. HER2 carboxyl-terminal fragments regulate cell migration and cortactin phosphorylation. **J Biol Chem** 2009; 284:25302-13.

Gebhart E, Ries J, Wiltfang J, Liehr T, Efferth T. Genomic gain of the epidermal growth factor receptor harboring band 7p12 is part of a complex pattern of genomic imbalances in oral squamous cell carcinomas. **Arch Med Res** 2004; 35:385-94.

Gou HF, Li X, Qiu M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-RAS signaling pathway in penile squamous cell carcinoma. **PLoS One** 2013; 8:e62175.

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.

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

Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. **Mod Pathol** 2014; 27:4-18.

Hernandez BY, Goodman MT, Unger ER, et al. Human papillomavirus genotype prevalence in invasive penile cancers from a registry-based United States population. **Front Oncol** 2014; 4:9.

Heyns CF, Fleshner N, Sangar V, Schlenker B, Yuvaraja TB, van Poppel H. Management of the lymph nodes in penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S43-57.

Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M, Franklin WA. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. **Lung Cancer** 2003; 41 Suppl 1:S29-42.

Horenblas S. Lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis Part 1: diagnosis of lymph node metastasis. **BJU Int** 2001; 88:467-72.

Hsieh CH, Chang JW, Hsieh JJ, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in patients with oral cavity cancer in a betel nut chewing-prevalent area. **Head Neck** 2011; 33:1758-64.

Hudelist G, Singer CF, Manavi M, Pischinger K, Kubista E, Czerwenka K. Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. **Breast Cancer Res Treat** 2003; 80:353-61.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54.

Hyun CL, Lee HE, Kim KS, et al. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. **J Clin Pathol** 2008; 61:317-21.

Isaksson S, Bendahl PO, Salomonsson A, et al. Detecting EGFR alterations in clinical specimens-pitfalls and necessities. **Virchows Arch** 2013; 463:755-64.

Järvinen TA, Liu ET. Topoisomerase IIalpha gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer--more common than anticipated. **Cytopathology** 2003; 14:309-13.

Jia XL, Chen G. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with adenosquamous carcinoma of the lung. **Lung Cancer** 2011; 74:396-400.

Jiang H, Bai X, Meng F, Zhang C, Zhang X. Evaluation of chromosome 17 polysomy in breast cancer by FISH analysis of whole nuclei, and its clinicopathological significance. **Oncol Lett** 2014; 7:1954-1958.

Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:2666-72.

Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. **J Clin Oncol** 2011; 29:2121-7.

Koifman L, Vides AJ, Koifman N, Carvalho JP, Ornellas AA. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. **Int Braz J Urol** 2011; 37:231-40.

Krustrup D, Jensen HL, van den Brule AJ, Frisch M. Histological characteristics of human papilloma-virus-positive and -negative invasive and in situ squamous cell tumours of the penis. **Int J Exp Pathol** 2009; 90:182-9.

Lamy PJ, Fina F, Bascoul-Mollevis C, et al. Quantification and clinical relevance of gene amplification at chromosome 17q12-q21 in human epidermal growth factor receptor 2-amplified breast cancers. **Breast Cancer Res** 2011; 13:R15.

Lavens N, Gupta R, Wood LA. EGFR overexpression in squamous cell carcinoma of the penis. **Curr Oncol** 2010; 17:4-6.

Liang Z, Zeng X, Gao J, et al. Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. **BMC Cancer** 2008; 8:363.

Lont AP, Gallee MP, Meinhardt W, van Tinteren H, Horenblas S. Penis conserving treatment for T1 and T2 penile carcinoma: clinical implications of a local recurrence. **J Urol** 2006a; 176:575-80.

Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. **Int J Cancer** 2006b; 119:1078-81.

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

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.

Martins AC, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci S Jr. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. **J Urol** 2002; 67:89-92.

Men HT, Gou HF, Qiu M, et al. A case of penile squamous cell carcinoma treated with a combination of antiepidermal growth factor receptor antibody and chemotherapy. **Anticancer Drugs** 2014; 25:123-5.

Milde-Langosch K, Karn T, Müller V, et al. Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2013;137(1):57-67.

Minhas S. Squamous cell carcinoma of the penis: therapeutic targeting of the epidermal growth factor receptor. **BJU Int** 2014; 113:845-6.

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

Muneer A, Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S. Molecular prognostic factors in penile cancer. **World J Urol** 2009; 27:161-7.

Necchi A, Nicolai N, Colecchia M, et al. Proof of activity of anti-epidermal growth factor receptor-targeted therapy for relapsed squamous cell carcinoma of the penis. **J Clin Oncol** 2011; 29:e650-2.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. **Eur J Cancer** 2001; 37 Suppl 4:S9-15.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene** 2006; 366:2-16.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J** 2000; 19:3159-67.

Orsaria M, Khelifa S, Buza N, Kamath A, Hui P. Chromosome 17 polysomy: correlation with histological parameters and HER2NEU gene amplification. **J Clin Pathol** 2013; 66:1070-5.

Pandey A, Noronha V, Joshi A, Tongaonkar H, Bakshi G, Prabhash K. Resistant metastatic penile carcinoma and response to biochemotherapy with paclitaxel and epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, nimotuzumab. **Indian J Med Paediatr Oncol** 2013; 34:24-7.

Pedersen K, Angelini PD, Laos S, et al. A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. **Mol Cell Biol** 2009; 29:3319-31.

Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JM. HER2 testing: current status and future directions. **Cancer Treat Rev** 2014; 40:276-84.

Pettaway CA, Pagliaro L, Theodore C, Haas G. Treatment of visceral, unresectable, or bulky/unresectable regional metastases of penile cancer. **Urology** 2010; 76(2 Suppl 1):S58-65.

Press MF, Sauter G, Buyse M, et al. Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. **J Clin Oncol** 2011; 29:859-67.

Protzel C, Knoedel J, Zimmermann U, Woenckhaus C, Poetsch M, Giebel J. Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. **Histol Histopathol** 2007; 22:1197-204.

Rieken M, Djajadiningrat RS, Kluth LA, et al. Predictors of cancer-specific mortality after disease recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **Eur Urol** 2014; [Epub ahead of print].

Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:7232-41.

Rocha RM, Ignácio JA, Jordán J, Carraro DM, et al. A clinical, pathologic, and molecular study of p53 and murine double minute 2 in penile carcinogenesis and its relation to prognosis. **Hum Pathol** 2012; 43:481-8.

Romero A, Martín M, Cheang MC, et al. Assessment of topoisomerase II α status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. **Am J Pathol** 2011; 178:1453-60.

Romero A, Caldés T, Díaz-Rubio E, Martín M. Topoisomerase 2 alpha: a real predictor of anthracycline efficacy?. **Clin Transl Oncol** 2012; 14:163-8.

Rosell R, Cecere F, Santarpia M, Reguart N, Taron M. Predicting the outcome of chemotherapy for lung cancer. **Curr Opin Pharmacol** 2006a; 6:323-31.

Rosell R, Taron M, Reguart N, Isla D, Moran T. Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway. **Clin Cancer Res** 2006b; 12:7222-31.

Ryott M, Wangsa D, Heselmeyer-Haddad K, et al. EGFR protein overexpression and gene copy number increases in oral tongue squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer** 2009; 45:1700-8

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

Sato-Kuwabara Y, Neves JI, Fregnani JH, Sallum RA, Soares FA. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. **BMC Cancer** 2009; 9:6.

Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. **Clin Cancer Res** 2006; 12:5268-72.

Scaltriti M, Verma C, Guzman M, et al. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. **Oncogene** 2009; 28:803-14.

Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, et al. Topoisomerase IIalpha expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:1029-37.

Schoen EJ, Oehrli M, Colby Cd, Machin G. The highly protective effect of newborn circumcision against invasive penile cancer. **Pediatrics** 2000; 105:E36.

Silva AM, Lisboa BC, Cunha IW, et al. Comment on: EGFR mutational status in Brazilian patients with penile carcinoma. **Expert Opin Ther Targets** 2013; 17:857-9.

Silva AMT. **Estudo da expressão proteica da família ErbB no carcinoma peniano**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio 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.

Sobin LH, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. **Cancer** 2010; 116:5336-9.

Sonpavde G, Pagliaro LC, Buonerba C, Dorff TB, Lee RJ, Di Lorenzo G. Penile cancer: current therapy and future directions. **Ann Oncol** 2013; 24:1179-89.

Spiess PE, National Comprehensive Cancer Network. New treatment guidelines for penile cancer. **J Natl Compr Canc Netw** 2013; 11(5 Suppl):659-62.

Stankiewicz E, Prowse DM, Ng M, et al. Alternative HER/PTEN/Akt pathway activation in HPV positive and negative penile carcinomas. **PLoS One** 2011; 6:e17517.

Stankiewicz E, Ng M, Cuzick J, et al. The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol** 2012; 65:534-7.

Tao RH, Maruyama IN. All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. **J Cell Sci** 2008; 121:3207-17.

Taoudi Benchekroun M, Saintigny P, Thomas SM, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer. **Cancer Prev Res (Phila)** 2010; 3:800-9.

Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, et al. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy. **J Clin Oncol** 2011; 29:4168-74.

Vanden Bempt I, Van Loo P, Drijckoningen M, et al. Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. **J Clin Oncol** 2008; 26:4869-74.

Velazquez EF, Ayala G, Liu H, Chaux A, et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:974-9.

Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. **Cell Mol Life Sci** 2008; 65:1566-84.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:118-45.

Zequi SC, Guimarães GC, da Fonseca FP, et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer A multicenter study. **J Sex Med** 2012; 9:1860-7.

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 - Resultados obtidos durante minha dissertação de mestrado (SILVA 2010) da análise da expressão de EGFR no carcinoma peniano

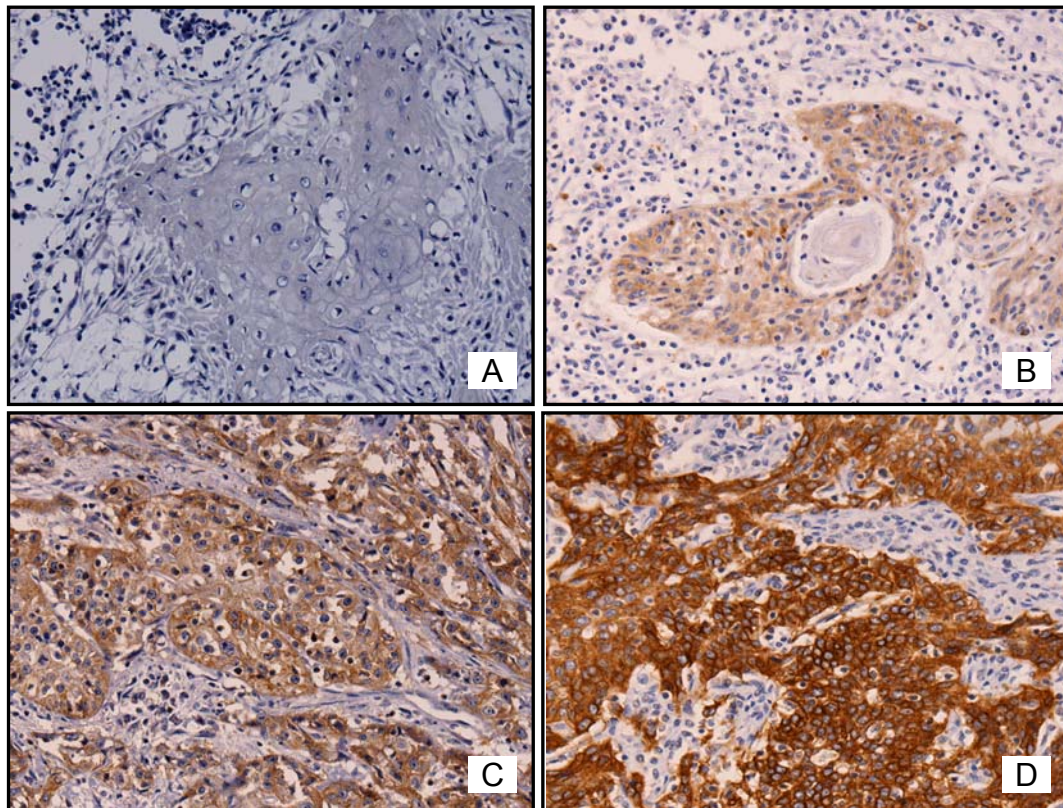


Figura 1 - Níveis de expressão de EGFR em carcinoma de pênis. Caso negativo 0 (A) e 1+ (B). C: Caso *borderline* (2+). D: Caso positivo (3+), aumento original 400x.

Tabela 1 – Associação da superexpressão de EGFR com recidiva.

Características	EGFR		p
	NEGATIVO	SUPEREXPRESSÃO	
Recidiva			
Não	74 (55,2%)	60 (44,8%)	0,031**
Sim	18 (36,7%)	31 (63,3%)	

** Teste exato de Fisher

Tabela 2 - Associação da positividade de EGFR e metástase em linfonodo.

Marcador	LN NEGATIVO	LN POSITIVO	p
EGFR			
Negativo (0 ou 1+)	1 (9,1%)	10 (90,9%)	0,045*
Positivo (2+ ou 3+)	24 (40,7%)	35 (59,3%)	

* Teste do chi-quadrado de Pearson

Anexo 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 10 de Setembro de 2010.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

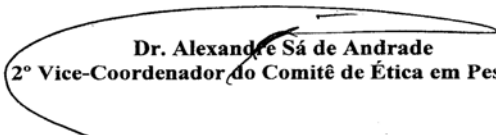
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1445/10
“Caracterização da localização subcelular e status fosforilativo dos membros da família ErbB no câncer peniano”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 31/08/2010, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os dados coletados, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração sobre uso e destino do material biológico, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração sobre a publicação dos dados de pesquisa utilizando amostras fornecidas e processadas pelo Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento da Dra. Vilma Regina Martins;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Cirurgia Pélvica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 10 de outubro de 2014.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1445/10
"O papel prognóstico dos receptores de fator de crescimento epidérmico EGFR e HER2 e do marcador de proliferação topoisomerase II α no carcinoma peniano".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 23/09/2014, **tomaram conhecimento** do seguinte documento:

- Comunicado de alteração de título do projeto acima referenciado, anteriormente intitulado "*Caracterização da localização subcelular e grau de fosforilação dos membros da família ErbB no câncer peniano*", datado de 01 de setembro de 2014.

Atenciosamente,



Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

**EXPERT
OPINION****Comment on: EGFR mutational status in Brazilian patients with penile carcinoma**

Alice Muglia Thomaz da Silva[†], Bianca Cristina Garcia Lisboa, Isabela Werneck da Cunha, Rafael Malagoli Rocha, Stenio Cassio Zequi, Gustavo Cardoso Guimarães, José Vassallo & Fernando Augusto Soares

[†]A. C. Camargo Cancer Center, CIPE – International Research and Teaching Center for Cancer, Sao Paulo, Brazil

The authors describe the results on EGFR molecular alterations of 29 Brazilian patients with penile carcinoma (PC). DNA extracted from frozen tumor tissue of all patients was submitted to direct sequencing of the four exons (18 – 21) responsible for the EGFR tyrosine-kinase activity. Corroborating the data by Di Lorenzo *et al.* published in *Expert Opin Ther Targets*, none of the sequenced tumor samples showed relevant alterations in the four studied exons of the EGFR gene.

Keywords: EGFR mutations, molecular diagnostics, penile carcinoma, target therapy, tyrosine-kinase inhibitors

Expert Opin. Ther. Targets [Early Online]

Dear Editor,

Penile carcinoma (PC) is a worrisome issue in developing countries. Thus, the recent publication by Di Lorenzo *et al.* [1] in this journal, on the mutational status of EGFR in PC, has caught our attention. In Brazil its incidence is higher than in industrialized countries, especially in less wealthy regions [2]. Therapeutic options are limited, with poor prognosis, especially for patients with metastatic disease. Therefore, new therapeutic targets are warranted, like EGFR. Di Lorenzo *et al.* evaluated the immunohistochemical expression of two markers for EGFR mutations (E746-A750, for deletion in exon 19; and L858R, for a point mutation in exon 21) on formalin-fixed, paraffin-embedded samples of 30 patients with PC. Although all of them were immunoreactive for EGFR, none presented the markers for such genetic alterations. We would like to further support their findings, by describing the results on EGFR molecular alterations of 29 Brazilian patients with PC. This study was undertaken after approval by the Ethics Committee of our institution, and applied on frozen samples. All cases were submitted to direct sequencing of the four exons encoding the EGFR tyrosine-kinase (TK) domain 18 – 21, frequently mutated in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) [3]. PCR products were purified with ExoSAP-IT (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA). Each exon was amplified individually and sequenced in both directions, using Big Dye v.3.1 (Applied Biosystems, Bedford, MA, USA), and separated on ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). Sequences were analyzed with the CLC Bio software and compared with the EGFR sequence. Corroborating the data by Di Lorenzo *et al.*, none of the sequenced tumor samples showed relevant alterations in the four exons studied. However, 19 out of the 29 cases exhibited an alteration in exon 20 (p.Q787Q), which has been described as a single nucleotide polymorphism in other tumor types, without clinical significance [4]. Patients with NSCLC harboring these activating mutations have demonstrated dramatic response to treatment with TK inhibitors targeting EGFR, like erlotinib and gefitinib. However, in PC, different alterations might play a role in the receptor's expression and activation. Regarding antibody-based therapies (cetuximab, for

informa
healthcare

instance), EGFR protein overexpression could be predictive of drug response. This approach was reported as presenting clinical benefits in a single patient with recurrent PC [5]. As the knowledge on the molecular mechanisms of PC is still limited, because of the relative rarity of this tumor in wealthier regions of the globe, further studies are necessary to support new therapeutic alternatives.

Bibliography

1. Di Lorenzo G, Buonerba C, Gaudioso G, et al. EGFR mutational status in penile cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(5):501-5
2. Guimaraes GC, Rocha RM, Zequi SC, et al. Penile cancer: epidemiology and treatment. *Curr Oncol Rep* 2011;13(3):231-9
3. Paz-Ares L, Soulières D, Melezínek I, et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med* 2010;14(1-2):51-69
4. Jia XL, Chen G. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2011;74(3):396-400
5. Necchi A, Nicolai N, Colecchia M, et al. Proof of activity of anti-epidermal growth factor receptor-targeted therapy for relapsed squamous cell carcinoma of the penis. *J Clin Oncol* 2011;29:e650-2

Affiliation

Alice Muglia Thomaz da Silva^{†1} MSc,
 Bianca Cristina Garcia Lisboa² MSc,
 Isabela Werneck da Cunha² MD PhD,
 Rafael Malagoli Rocha^{1,2} PhD,
 Stenio Cassio Zequi³ MD PhD,
 Gustavo Cardoso Guimarães³ MD PhD,
 José Vassallo^{1,2,4} MD PhD &
 Fernando Augusto Soares^{1,2} MD PhD
[†] Author for correspondence
¹A. C. Camargo Cancer Center,
 CIPE – International Research and Teaching
 Center for Cancer,
 Rua Taguá, #440,
 Liberdade - 01508-010 – São Paulo-SP,
 Brazil
 Tel: +55 11 21895185;
 E-mail: licemuglia@yahoo.com.br
²A. C. Camargo Cancer Center,
 Department of Anatomic Pathology,
 Sao Paulo, Brazil
³A. C. Camargo Cancer Center,
 Department of Pelvic Surgery,
 Sao Paulo, Brazil
⁴State University of Campinas School of
 Medicine (Unicamp),
 CIPED, Laboratory of Investigative and
 Molecular Pathology, São Paulo, Brazil

Declaration of interest

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Foundation for Research Support of the State of São Paulo, or FAPESP). The authors declare that there is no conflict of interest associated with this letter.

Authors' reply

Therapeutic improvements in the management of inoperable penile cancer have been incredibly slow [1]. The use of cisplatin and 5-fluorouracil was based on only a few cases (< 10) reported decades ago until recent results published by our work group [2]. On such basis, we appreciate the efforts by Da Silva *et al.*, who provide useful data about EGFR

mutational status in penile cancer. It must be noted that presence of Q787Q silent mutations in exon 20 was not clearly associated to response to gefitinib or erlotinib in lung cancer, as discussed by Jia and Chen [3]. Given the rarity of the disease, the lack of interest of big pharmaceutical companies and the difficulty in enrolling patients in prospective trials, we still believe that experimentation of erlotinib and gefitinib is not presently a priority in penile cancer.

Bibliography

1. Sonpavde G, Pagliaro LC, Buonerba C, et al. Penile cancer: current therapy and future directions. *Ann Oncol* 2013. [Epub ahead of print]
2. Di Lorenzo G, Buonerba C, Federico P, et al. Cisplatin and 5-fluorouracil in inoperable, stage IV squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int* 2012;110(11 Pt B):E661-6
3. Jia XL, Chen G. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with adenosquamous carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2011;74(3):396-400

Affiliation

Giuseppe Di Lorenzo^{†1} MD PhD,
Carlo Buonerba¹, Vincenzo Gigantino²,
Sisto Perdonà³, Michele Caraglia⁴ &
Renato Franco²

[†]Author for correspondence

¹University Federico II, Genitourinary Cancer
Section and Rare-Cancer Center, Medical
Oncology Division, Napoli, Italy
Tel: +39 081 7463660; Fax: +39 081 2203147;
E-mail: giuseppedilorenzoncol@hotmail.com

²National Cancer Institute "Fondazione Giovanni
Pascale", Pathology Unit, Naples, Italy

³National Cancer Institute "Fondazione Giovanni
Pascale", Urology Division, Naples, Italy

⁴Second University of Naples, Department of
Biochemistry and Biophysics, Naples, Italy

Anexo 4 - Gráficos Kaplan-Meier com curvas de sobrevida global das variáveis clínicas, patológicas e moleculares dos tumores penianos avaliados neste estudo.

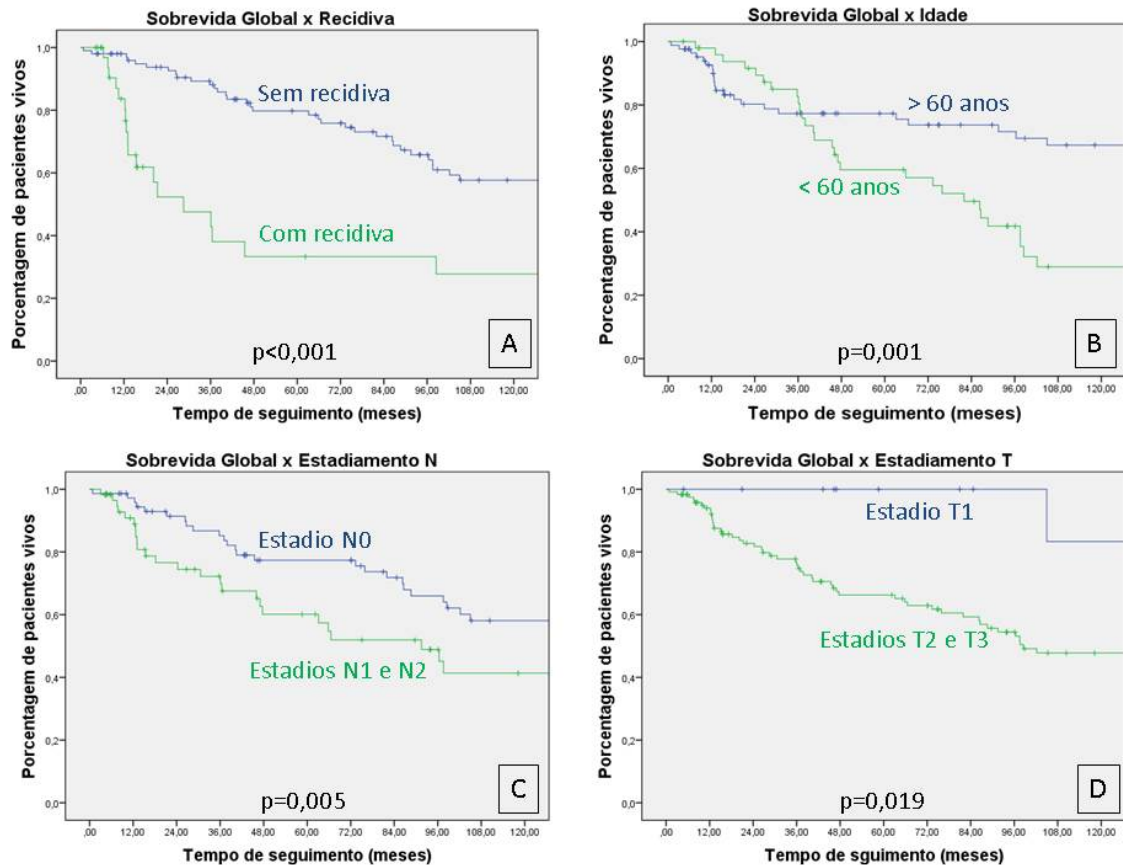


Figura 1 - Curvas de sobrevida global de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis clínicas com diferença estatisticamente significativa: (A) presença de recidivas ($p < 0,001$); (B) idade ($p = 0,001$); (C) estadiamento T ($p = 0,019$) e estágio clínico N ($p = 0,005$).

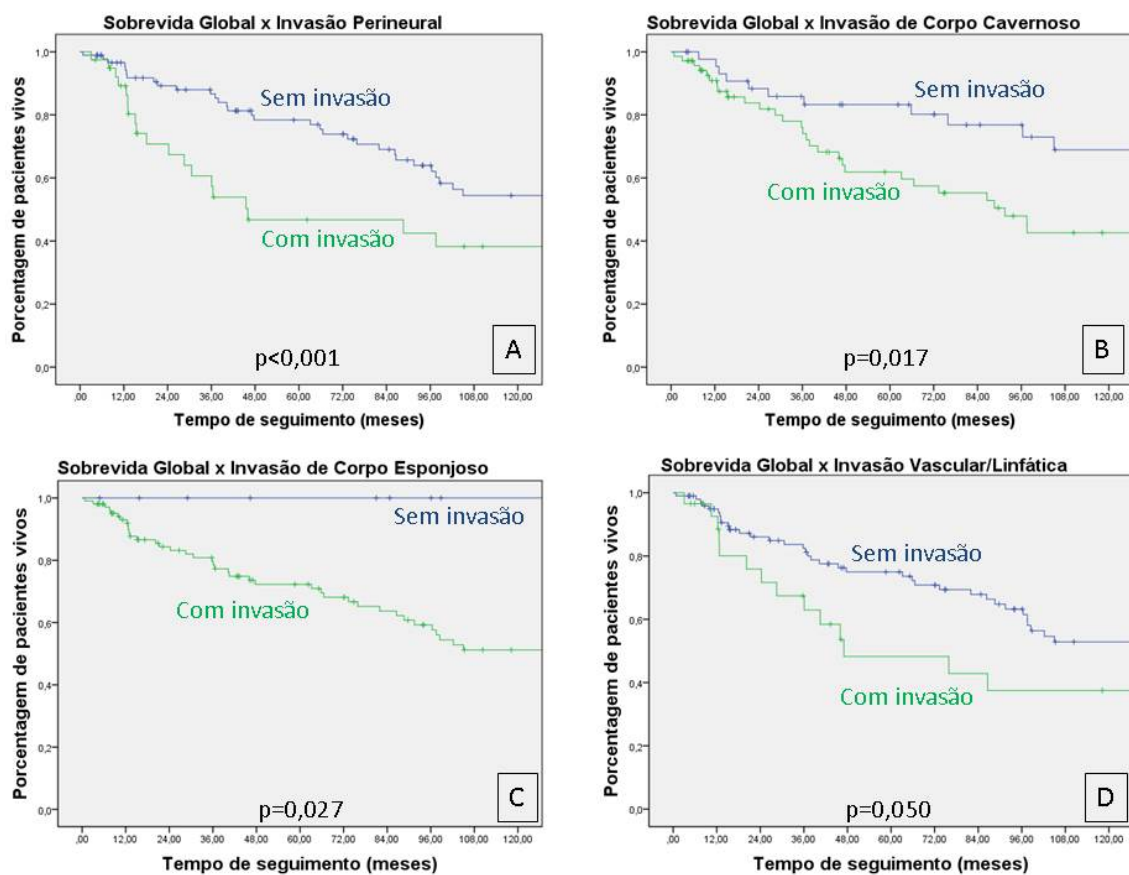


Figura 2 - Curvas de sobrevida global de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis patológicas com diferença estatisticamente significativa: (A) invasão perineural ($p < 0,001$); (B) invasão de corpo cavernoso ($p = 0,017$); (C) invasão de corpo esponjoso ($p = 0,027$) e invasão vasculo-linfática ($p = 0,050$).

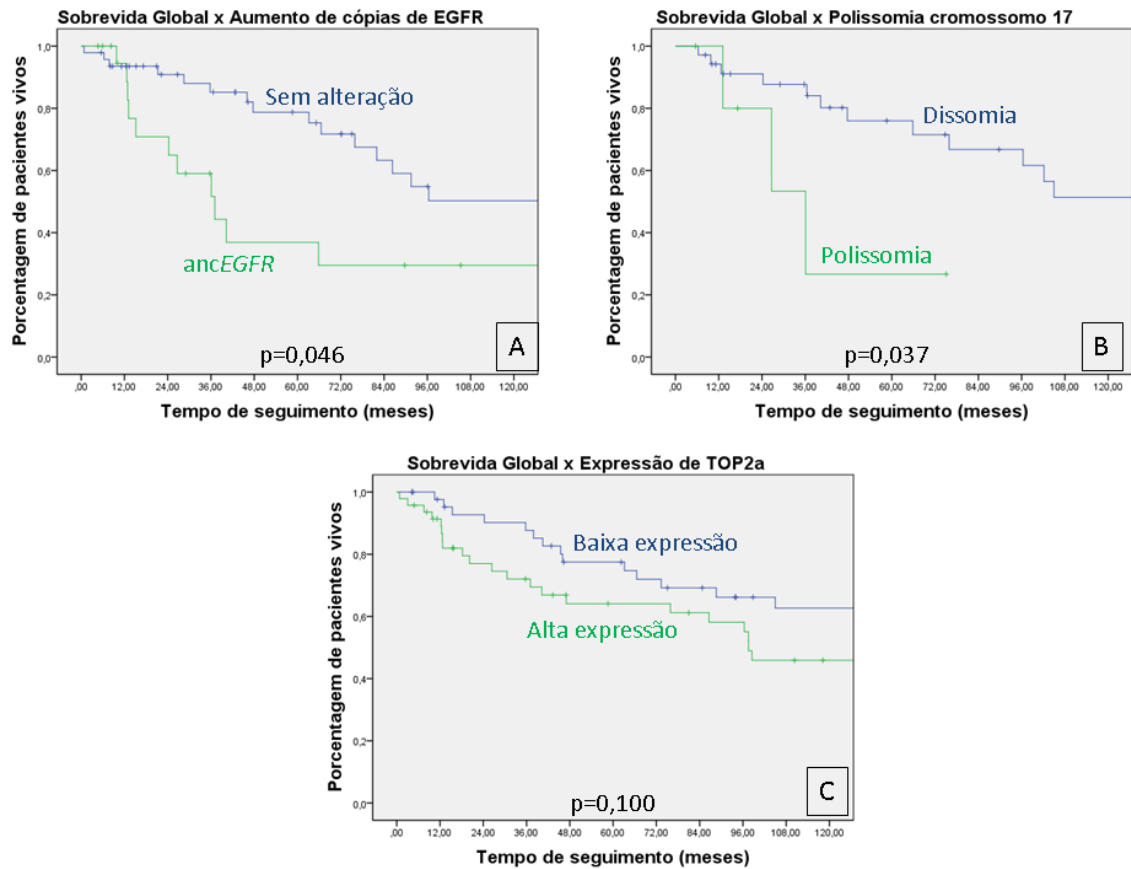


Figura 3 - Curvas de sobrevida global de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis moleculares: (A) aumento do número de cópias de *EGFR* (anc*EGFR*) ($p=0,046$); (B) polissomia do cromossomo 17 ($p=0,037$); (C) expressão de TOP2a ($p=0,100$).

Anexo 5 - Gráficos Kaplan-Meier com curvas de sobrevida câncer-específica das variáveis clínicas, patológicas e moleculares dos tumores penianos avaliados.

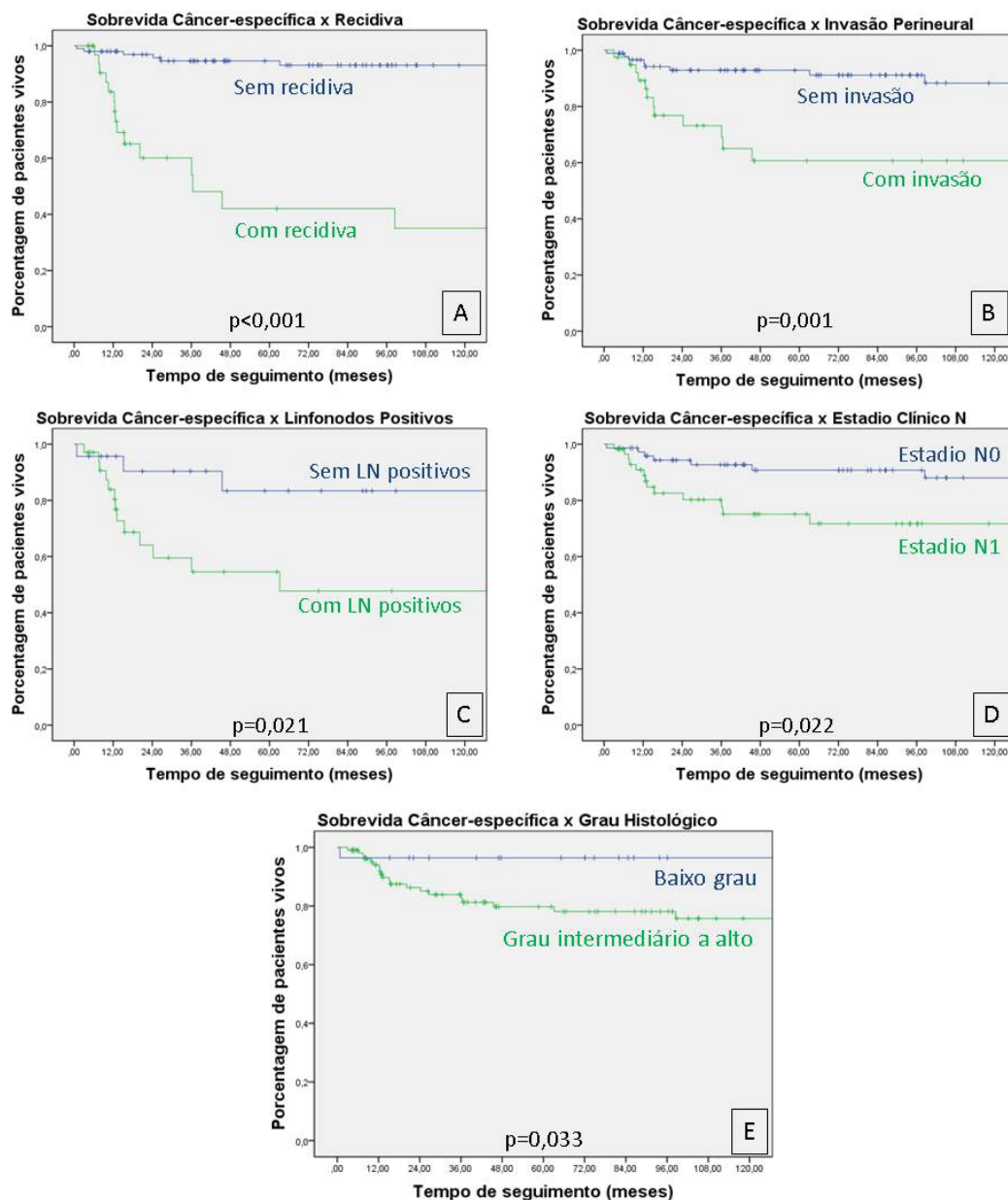


Figura 1 - Curvas de sobrevida câncer-específica de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis clínicas e patológicas com diferença estatisticamente significativa: (A) presença de recidivas ($p < 0,001$); (B) invasão perineural ($p = 0,001$); (C) presença de linfonodos positivos no exame patológico ($p = 0,021$); (D) estadio clínico N ($p = 0,022$) e (E) grau histológico intermediário a alto ($p = 0,033$).

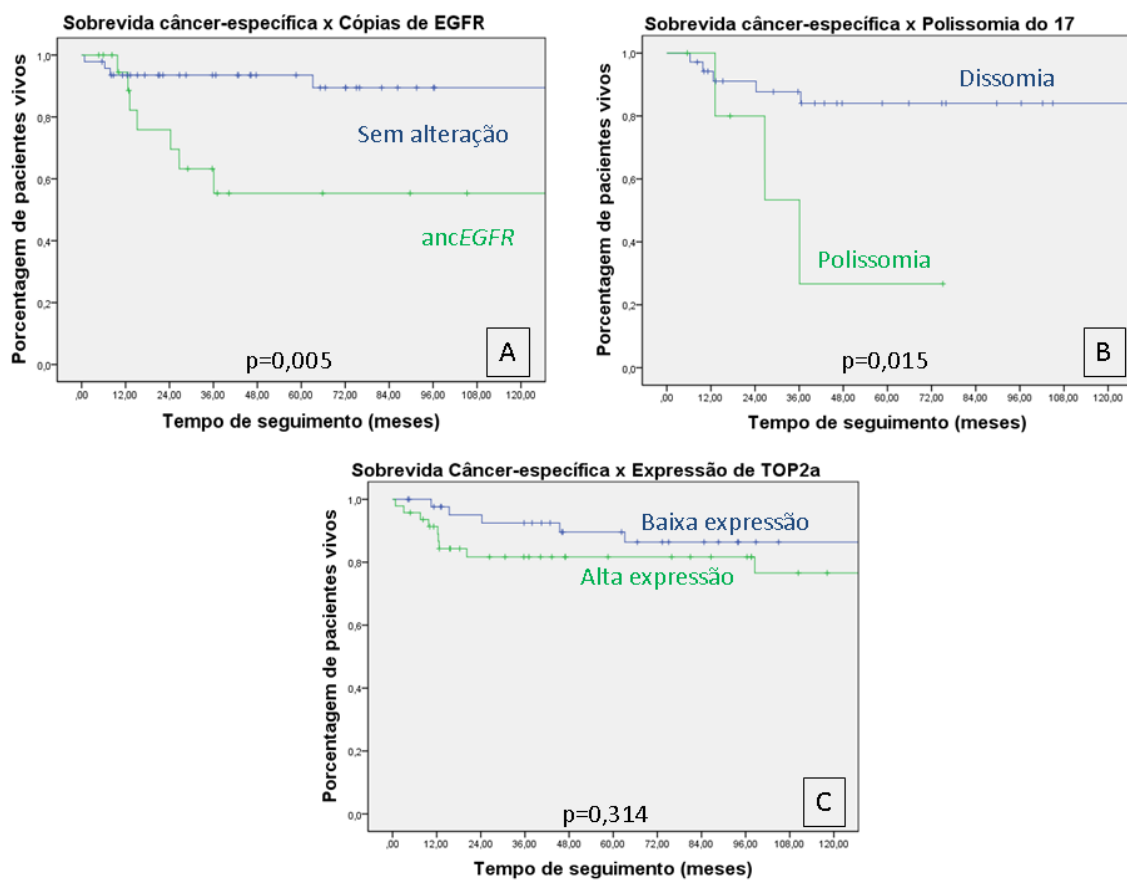


Figura 2 - Curvas de sobrevida câncer-específica de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis moleculares: (A) Aumento do número de cópias de *EGFR* (ancEGFR) ($p=0,005$); (B) polissomia do cromossomo 17 ($p=0,015$) e (C) expressão de TOP2a ($p=0,314$).

Anexo 6 - Gráficos Kaplan-Meier com curvas de sobrevida livre de recidiva das variáveis clínicas, patológicas e moleculares dos tumores penianos avaliados.

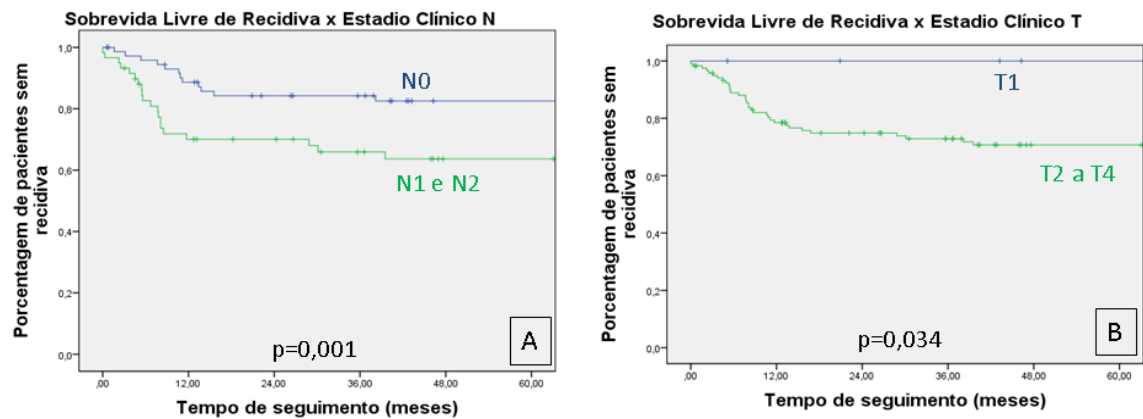


Figura 1 - Curvas de sobrevida livre de recidiva de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis clínicas com diferença estatisticamente significativa: (A) Estadiamento N ($p=0,001$) e estadiamento T ($p=0,034$).

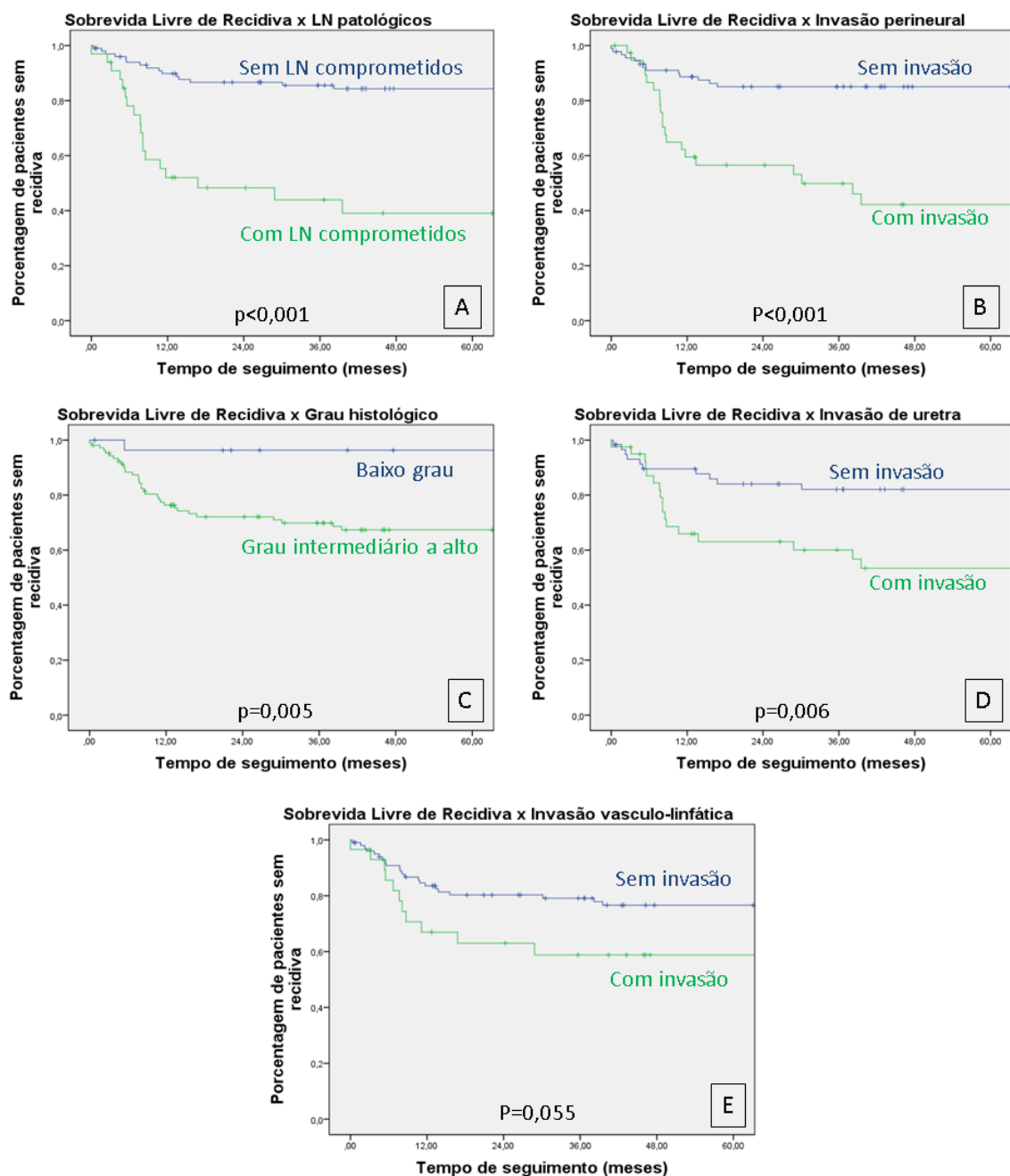


Figura 2 - Curvas de sobrevida livre de recidiva de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis patológicas com diferença estatisticamente significativa: (A) Linfonodos comprometidos no exame patológico ($p < 0,001$), invasão perineural ($p < 0,001$), grau histológico de intermediário a alto ($p = 0,005$), invasão de uretra ($p = 0,006$). A diferença de SLR entre casos com e sem invasão vascular ou linfática (E) não atingiu significância estatística ($p = 0,055$).

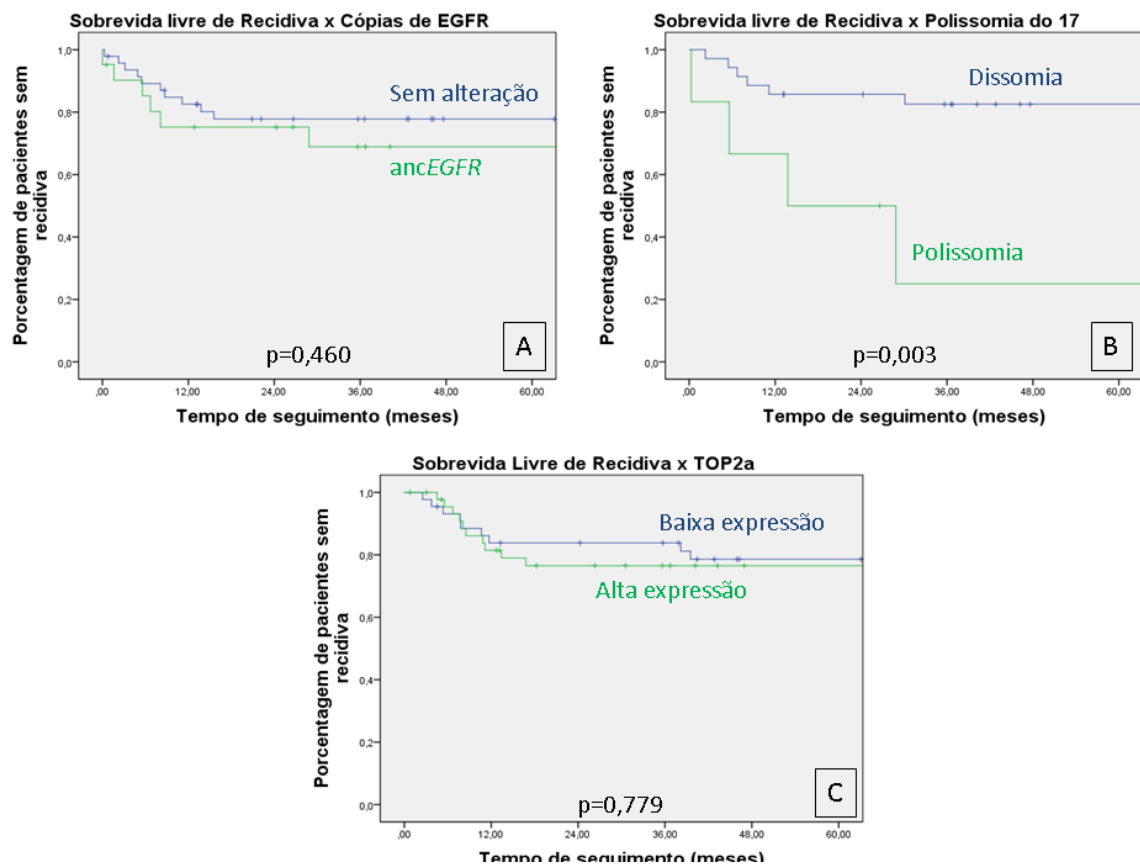


Figura 3 - Curvas de sobrevida livre de recidiva de pacientes com carcinoma peniano de acordo com variáveis moleculares: (A) Aumento do número de cópias de *EGFR* (ancEGFR) ($p=0,460$); (B) polissomia do cromossomo 17 ($p=0,003$) e (C) expressão de TOP2a ($p=0,779$).