

**PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO E MOLECULAR DO
CANCER DE PÊNIS EM PACIENTES ATENDIDOS EM
UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO
NORDESTE BRASILEIRO**

**MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO
SALDANHA DA CUNHA**

**Tese apresentada à Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional (DINTER) em
Oncologia da Fundação Antônio Prudente em
Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará, para
a obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

Co-Orientador: Dr. Marcos Venicio Alves Lima

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Cunha, Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da
**Perfil clínico-patológico e molecular do câncer de pênis em
pacientes atendidos em um centro de referência em oncologia no
nordeste brasileiro** / Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha - São
Paulo; 2017.

57p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de
Oncologia-ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional(DINTER)

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Neoplasias penianas/Penile Neoplasms. 2. Fator
de Crescimento Epidérmico/Epidermal Growth Factor 3. Genes erbB-1/
Genes, erbB-1. 4. Serviços de Informação/Information Services

“ no começo era uma pelezinha de nada, eu puxava a pontinha e arrancava, ela crescia de novo, eu descascava e ela tornava, e foi ficando maior...apareceu uma ferida, começou a doer e eu botava em água fervendo e não passava...quando já estava tudo tomado, deixei de urinar....foi quando apareceram os bichos....”

DEDICATÓRIA

A minha família, todo amor que houver nessa vida.
Ao Alessandro Ernani, Arthur Ernani e Tibério Augusto, o infinito e além...

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares e Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima, gratidão pelo convívio e ensinamentos gentilmente compartilhados.

Aos professores do DINTER pela disponibilidade ao longo da jornada.

Ao A.C.Camargo Cancer Center pelo acolhimento do projeto e todo auxílio prestado no decorrer desses anos

A FUNCAP pelo apoio e viabilização financeira e acreditar que o conhecimento científico é ferramenta eficaz contra as adversidades

Ao Instituto do Câncer do Ceará pela concretização do projeto e seus valores e princípios em busca do conhecimento e da arte de cuidar

A ECO, pelos momentos de crescimento e aprendizado

Aos médicos e funcionários do laboratório de patologia Livino Pinheiro em especial à Nair e ao Nilson, é sempre uma alegria conviver com vocês.

Às estimadas Josiane Quetz, Deysi Wong e Isabelle Silva do departamento de Biologia Molecular, que ensinam com a alma e um sorriso franco

Às competentes Manoela Sales, Shirley Queirós e Veralúcia Menezes do setor de Imunohistoquímica, pela organização e comprometimento

Ao médicos do serviço de Urologia do HHJ/ICC, pelo cuidado, zelo e excelência em busca de dias melhores para cada paciente

Aos dedicados bolsistas de iniciação científica Saymon Medeiros, João Victor Monteiro e Luiz Vianney Cidrão, eu vejo flores em vocês.

As bibliotecárias Larisse Macêdo e Suely Francisco pelo apoio na formatação e busca de dados, ao Dr. Paulo Goberlânio pelo auxílio no tratamento estatístico aos dados coletados, ao Dr. Eduardo Neves pelo apoio logístico e captura de imagens, um agradecimento de coração

A Enfa. Luana Caldini pela organização criteriosa de arquivos de lâminas e blocos selecionados

Aos estimados mestres Dalgimar Menezes e Marcelo Gurgel, minha admiração e gratidão

Ao querido Ronaldo Ribeiro, onde estiver.

RESUMO

Cunha MPSS. **Perfil clínico-patológico e molecular do cancer de pênis em pacientes atendidos em um centro de referência em oncologia no nordeste brasileiro**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará].

O carcinoma de pênis (CaPe) é um dos desafios para a saúde pública no Brasil, correspondendo a cerca de 2,1% dos tumores masculinos, com incidência maior nas regiões norte e nordeste. Principais fatores de risco são más condições de higiene, baixo padrão sócio-econômico, fimose, tabagismo, número de parceiros sexuais e infecção pelo HPV. Acometimento linfonodal é o que mais se relaciona à diminuição da sobrevida. Genes que têm papel na proliferação e regulação celular podem estar envolvidos no seu desenvolvimento e progressão tumoral. Os genes EGFR, KRAS E BRAF fazem parte da via de sinalização das proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPK) que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Este estudo avaliou 108 pacientes com carcinoma peniano e pesquisou o status mutacional dos genes BRAF, KRAS e EGFR, bem como expressão de c-erbB2 correlacionando-os com dados clínico-patológicos. Apenas um paciente apresentou mutação de KRAS e outro a hiperexpressão de c-erbB-2. Carcinomas bem diferenciados se correlacionaram positivamente com a presença de coilócitos, invasão de lâmina própria e ao estágio pT1. IPE de alto risco, invasão vascular, perineural e margens positivas se correlacionaram positivamente com a recorrência. O IPE de alto risco se relacionou com menor sobrevida. Sobrevida global e livre de doença após 2 anos de seguimento foram respectivamente 93,8% e 81,0 %. Curvas de sobrevida livre de doença foram significativamente relacionada à recorrência, envolvimento nodal e IPE de alto risco.

Descritores: Neoplasias penianas. Fator de Crescimento Epidérmico. Genes erbB-1. Serviços de Informação

SUMMARY

Cunha MPSS. **[Molecular, clinical and pathology calfeatures of patients with penile carcinoma in a cancer center from Brazilian Northeast.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará].

The penile carcinoma (CAPE) nowadays is one of the major problems and challenges for public health in Brazil, accounting for approximately 2.1% of all tumors of the Brazilian men, showing a higher incidence in the North and Northeast regions. The main risk factors include poor hygiene, low socioeconomic status, and phimosis, tobacco exposure, number of sexual partners and HPV infection. The presence of lymph node involvement is the most important factor related to decreased survival. Genes EGFR, BRAF and KRAS are part of the signaling pathway of mitogen-activated protein kinases (MAPK) which that control cell proliferation and differentiation. This study evaluated 108 patients with penile carcinoma and accessed the mutational status of BRAF, KRAS and EGFR in these cases, considering their clinical outcome. In our analyses, one mutation was founded in KRAS and one c-erbB2 overexpression was observed. Well-differentiated carcinomas were positively correlated to the presence of koilocytes, lamina propria invasion and to stage pT1. Conversely, high risk score prognostic index, vascular invasion, perineural invasion and positive margins were significantly correlated to recurrence. Furthermore, high risk SPI was related to a shorter survival. Overall survival and disease-free survival after 2 years of follow-up were 93,8 % and 81,0% respectively. Curves of disease-free survival, in addition, were significantly related to the recurrence status, nodal involvement and high risk SPI.

Key-words: Penile Neoplasms. Epidermal Growth Factor. Genes, erbB-1. Information Services

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias de sinalização PI3k/AKT e Raf/MAPK ativadas pelos receptores HER	8
Figura 2	Padrão de imunomarcação e escores utilizados para avaliação de expressão de c-erbB-2	15
Figura 3	Reprodução de lâminas coradas por HE de CEC de pênis de pacientes incluídos no estudo.....	25
Figura 4	Carcinoma de células escamosas de pênis de pacientes incluídos no estudo	26
Figura 5	Reprodução de lâminas de HE de subtipos de carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes incluídos no estudo.....	28
Figura 6	Reação de imunohistoquímica com anticorpo policlonal c-erbB-2 DAKO®, magnitude de 200.....	30
Figura 7	Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) em pacientes portadores de carcinoma de pênis no ICC no período de 2002 a 2016	38
Figura 8	Curva de sobrevida livre de doença (Kaplan Meier) em pacientes portadores de carcinoma de pênis no ICC no período de 2002 a 2016	39

Figura 9	Curva de sobrevida câncer específica (Kaplan Meier) de acordo com o status linfonodal (pN) em pacientes portadores de carcinoma de pênis no ICC no período de 2002 a 2016	40
Figura 10	Curva de sobrevida câncer específica em função do IPE de alto e não alto risco em pacientes portadores de carcinoma de pênis no ICC no período de 2002 a 2016	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequências absoluta e relativa de média de idade, procedência, etnia e vínculo de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC.....	20
Tabela 3	Tipos de cirurgia realizada na primeira abordagem de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC.....	21
Tabela 3	Frequências absoluta e relativa do tipo de abordagem linfonodal de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC	21
Tabela 4	Estadio pT, pN e comprometimento de margem cirúrgica de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC.....	23
Tabela 5	Características relacionadas ao tumor de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC.....	24
Tabela 6	Distribuição de acordo com o subtipo e diferenciação histológica de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC	27
Tabela 7	Distribuição de carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC em relação ao Índice prognóstico de escores	29
Tabela 8	Frequência de coilocitose em lâminas de HE em carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC	29

Tabela 9	Frequência da expressão de c-erbB-2 por imunohistoquímica em carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC	30
Tabela 10	Frequência de mutações nos genes BRAF, EGFR e KRAS avaliadas por RT-PCR em carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC.....	31
Tabela 11	Frequência de recidiva de carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC.....	32
Tabela 12	Frequência da perda de seguimento de pacientes do ICC com carcinoma de células escamosas do pênis	32
Tabela 13	Associação entre carcinoma de células escamosas do pênis de subtipo usual e variáveis clínicopatológicas (idade, estadiamento patológico, IPE, margens cirúrgicas, invasividade, grau histológico e bordas de invasão microscópica) de pacientes do ICC	33
Tabela 14	Associação entre metástase linfonodal e variáveis clínico patológicas (estadiamento patológico, IPE, invasão perineural e vascular) de pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis.....	34
Tabela 15	Associação do grau histológico G1 (baixo grau) e das variáveis clínico cirúrgicas: estadiamento patológico, abordagem linfonodal, metástase linfonodal, tamanho do tumor, invasão de lâmina própria, corpo esponjoso ou corpo cavernoso, coilocitose, invasão perineural e vascular) de pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis.....	35

Tabela 16	Associações significantes do estágio pT1 em pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis.....	36
Tabela 17	Associações significantes entre a recidiva e as variáveis anatomopatológicas em pacientes do ICC com carcinoma de células escamosas do pênis.....	36
Tabela 18	Associação entre IPE alto risco e variáveis clínico-cirúrgicas de pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	Proteína Quinase B
ATP	Adenosina Trifosfato
BRAF	Gene Codificador da Proteína B-Raf
B-Raf	Proteína Quinase Serina/Treonina
CaPe	Carcinoma de Pênis
CEC	Carcinoma de células escamosas
c-erbB-2	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog - Type 1</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ErbB	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog</i>
ErbB-1	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog - Type 1</i>
FC	Fatores de Crescimento
HER	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor - Type 2</i>
ErbB-2	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog- Type 2</i>
HER2/Neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor - Type 2</i>
HER3	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor - Type 3</i>
ErbB-3	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog- Type 3</i>
HER4	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor - Type 4</i>
ErbB-48	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog- Type 48</i>
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
MAPK	Proteína Quinase Ativadora De Mitose
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
NOS	<i>No Other Specification</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de Crescimento derivado de Plaquetas
Pi3K	<i>Fosfatidilinositol 3-Quinase</i>

PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma Viral Oncoprotein Homolog</i>
RTK	Receptores Tirosinoquinase
SCF	Fator de Células Tronco
SH2	<i>Src Homology Type 2 Domain</i>
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1	Tipo de Estudo	12
3.2	Local e Período de Estudo	12
3.3	Pacientes.....	12
3.3.1	Critérios de inclusão	12
3.3.2	Critérios de exclusão	13
3.3.3	Coleta de dados protocolo de estudo de carcinoma de pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	13
3.3.4	Revisão anatomopatológica	14
3.4	Imunohistoquímica para Detecção de C-ERBB-2.....	14
3.5	Extração de DNA para Biologia Molecular.....	15
3.5.1	Rastreamento de mutação no gene KRAS.....	17
3.5.2	Rastreamento de mutação no gene BRAF	18
3.5.3	Rastreamento de mutação no gene EGFR.....	18
3.6	Análise Estatística	18
3.7	Aspectos Éticos	19
3.8	Financiamento	19
4	RESULTADOS.....	20
4.1	Dados Sócio-demográficos.....	20
4.2	Dados Cirúrgicos	21
4.3	Dados Anatomopatológicos.....	22
4.4	Dados de Biologia Molecular	31

4.5	Dados de Seguimento	32
4.6	Dados e Análises Inferenciais	32
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

APÊNDICES

Apêndice 1 Epidermal growth factor receptor as an adverse survival predictor in squamous cell carcinoma of the penis

Apêndice 2 Lista de variáveis

ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de estudo carcinoma de pênis do Hospital A.C. Camargo

Anexo 2 Livreto de orientação para preenchimento do protocolo de estudo carcinoma de pênis

Anexo 3 Classificação TMN

Anexo 4 Classificação de carcinoma de pênis WHO 2016

Anexo 5 Aprovação do CEP

Anexo 6 Declaração de vínculo de instituição participante

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pênis (CaPe) é pouco frequente em países desenvolvidos, onde responde por cerca de 0,6% de todas neoplasias malignas. Representa um desafio nos países em desenvolvimento, onde constitui cerca de 10% dos tumores malignos do homem (MISRA et al. 2004). A Índia possui a maior incidência desta neoplasia (3,32/100000 habitantes), sendo o tumor mais comum entre homens de Uganda. Os menores índices estão entre os judeus nascidos em Israel e nos EUA (0/100000 e 0,07/100000, respectivamente) (MISRA et al. 2004; MOSCONI et al. 2005; GOODMAN et al. 2007; BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007).

No Brasil, corresponde a aproximadamente a 2,1% de todos os tumores no sexo masculino, com maior incidência nas regiões norte e nordeste, relacionando-se às piores condições sócio-econômicas (ORNELLAS et al. 1994). Apesar do impacto desta neoplasia, há poucos estudos que ofereçam dados confiáveis em relação aos aspectos morfológicos e às variações locorregionais existentes no Brasil. Aspectos epidemiológicos, levando em consideração hábitos e comportamentos sexuais locais, variantes histológicas pouco conhecidas ou recentemente contemplada na classificação vigente da OMS, que evoluem de forma não usual, podem embutir considerações novas que acrescentem informações ao manejo desses pacientes (FAVORITO et al. 2008; ZEQUI et al. 2012).

A etiopatogenia do CaPe é pouco conhecida. A presença de fimose, más condições de higiene e baixo padrão sócio-econômico são os principais fatores de risco para desenvolvimento do CaPe (MISRA et al. 2004). Outros fatores incluem o número de parceiros sexuais e a exposição ao tabaco (BLEEKER et al. 2009). Evidências sugerem duas vias distintas relacionadas à carcinogênese peniana: uma com envolvimento do HPV e outra relacionada a fatores predisponentes e de natureza inflamatória (CUBILLA et al. 2012). A infecção pelo papilomavírus humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*) está presente em cerca de 40% dos casos, com predileção por certos tipos histológicos, como o condilomatoso e o basalóide (BACKES et al. 2009; MUNEER et al. 2009; CHAUX et al. 2012).

O CaPe é essencialmente uma doença locorregional, sendo raro o desenvolvimento de doença metastática. A sobrevida dos pacientes é determinada pelo acometimento linfonodal (LOPES et al. 1996a). Ao contrário do papel que representa em outros tipos de tumores, a pesquisa de linfonodo sentinela no CaPe não apresenta a acurácia esperada para torná-la um procedimento padrão (HORENBLAS 2001; HEYNS e THERON 2008; CRAWSHAW et al. 2009; JENSEN et al. 2009) e torna-se imprescindível o conhecimento de aspectos biomoleculares que poderão ampliar as ferramentas disponíveis para uma melhor avaliação pré-operatória dos pacientes, permitindo um planejamento terapêutico mais criterioso e evitando morbidade por eventuais procedimentos cirúrgicos (GUIMARÃES et al. 2011).

Cerca de 95% dos casos de CaPe são constituídos por carcinomas derivados do epitélio pluriestratificado, tanto da glândula como do sulco coronal e prepúcio (CUBILLA et al. 1993; VELAZQUEZ e CUBILLA 2007). Deste total, cerca de 70% são carcinomas epidermóides usuais e 30% são constituídos por tipos especiais. De acordo com a recente padronização da OMS acerca da classificação histológica do CaPe, destacam-se uma variedade de subtipos, tais como carcinoma basalóide, variantes verrucosas (condilomatoso, papilífero, verrucoso) e carcinomas sarcomatóides (CUBILLA et al. 2000, 2004; CUNHA et al. 2009; VELAZQUEZ et al. 2005). Recentemente, novos tipos histológicos foram reconhecidos na classificação da OMS tais como carcinoma cuniculatum, carcinoma pseudo-hiperplásico, carcinoma “wharty”-basalóide e carcinoma verrucoso híbrido e merecem atenção particular pois pouco se conhece acerca de seu comportamento (CUBILLA et al. 2012; MOCH et al. 2016).

A classificação correta do subtipo, pode dar informações bastante úteis em relação ao comportamento biológico do tumor. Dentre eles podemos destacar o grau histológico (VELAZQUEZ et al. 2008), a invasão vascular (LOPES et al. 1996b), a invasão perineural (CHAUX et al. 2009) e o padrão de invasão do tumor e interface tumoral, como aspectos importantes quando avaliados sobrevida ou acometimento linfonodal (GUIMARÃES et al. 2006; AITA et al. 2015; DA CUNHA et al. 2016).

No Brasil, não sabemos a real frequência e o impacto de uma classificação adequada em relação a vários e distintos subtipos histológicos do CaPe. Apesar de sermos um país com quantidade significativa de

casos, patologistas ainda se mostram pouco familiarizados com as novas variantes e suas facetas morfológicas. Frequentemente, tais tumores são subclassificados de forma equivocada e todos alocados como carcinomas de células escamosas usuais. Tal conduta impede que clínicos e cirurgiões estabeleçam estratégias mais adequadas como prevenção e rastreo, opções de tratamento e seleção de pacientes elegíveis a linfadenectomia inguinal (GUIMARÃES et al. 2009; ORNELLAS et al. 2008).

Estudo recente demonstrou um comportamento similar entre alguns subtipos histológicos, o que se levou a proposição de três grandes grupos prognósticos, I, II e III (SANCHEZ et al. 2015). O grupo dito de excelente prognóstico ou grau I abrangeria os carcinomas verrucosos, papilares NOS, pseudohiperplásticos e cuniculatum; grau II abrangeria os usuais, mistos e condilomatosos e grau III, de pior prognóstico, os subtipos com alto grau nuclear, basalóide, condilomatoso-basalóide, papilar-basalóide e sarcomatóide.

Não obstante a dificuldade na classificação dos vários subtipos do CaPe, a etiopatogenia molecular se torna um grande desafio. A casuística reduzida e polvilhada ao longo do Brasil, aliada à ausência de boa documentação científica e correlação clínico-cirúrgica, constituem agravantes para que se evolua nos conceitos e propostas terapêuticas. Pesquisas envolvendo o conhecimento da expressão de proteínas através de imunoistoquímica vêm se avolumando, despertando a necessidade de aprofundar os conhecimentos em nível molecular, com o conhecimento da expressão e rastreo de mutações em genes sabidamente relacionados ao

câncer, bem como suas vias de ativação e sinalização (PROTZEL et al. 2013; MENTRIKOSKI et al. 2014).

O papel dos fatores de crescimento (FC) nos processos celulares é bem estabelecido, participando de etapas fundamentais na célula normal, e se relacionam a proliferação, diferenciação, metabolismo, sobrevivência celular, migração e controle do ciclo. Em condições neoplásicas, alterações nos FC, receptores ou vias de sinalização dão suporte à habilidade de uma célula maligna se desenvolver e replicar, o que caracteriza as peculiaridades elencadas por HANAHAN e WEINBERG (2011): autosuficiência, insensibilidade aos supressores de crescimento celular, escape à apoptose, indução de angiogêneses, invasão e metástases.

Os receptores para os fatores de crescimento são proteínas presentes em todas as células e se agrupam de acordo com a sua natureza e mecanismos de transdução de sinais. Eles se dividem em tipo I (canais iônicos controlados por ligantes/ ionotrópicos), tipo II (acoplados à proteína G/ metabotrópicos), tipo III (ligados à quinase e correlatos) e tipo IV (receptores nucleares) que regulam a transcrição gênica.

Os receptores para os fatores de crescimento presentes em todas as células, por sua vez, agrupam-se de acordo com a sua natureza e mecanismos de transdução de sinais: tipo I (canais iônicos controlados por ligantes/ ionotrópicos); tipo II (acoplados à proteína G/ metabotrópicos); tipo III (ligados à quinase e correlatos); tipo IV (receptores nucleares) que regulam a transcrição gênica.

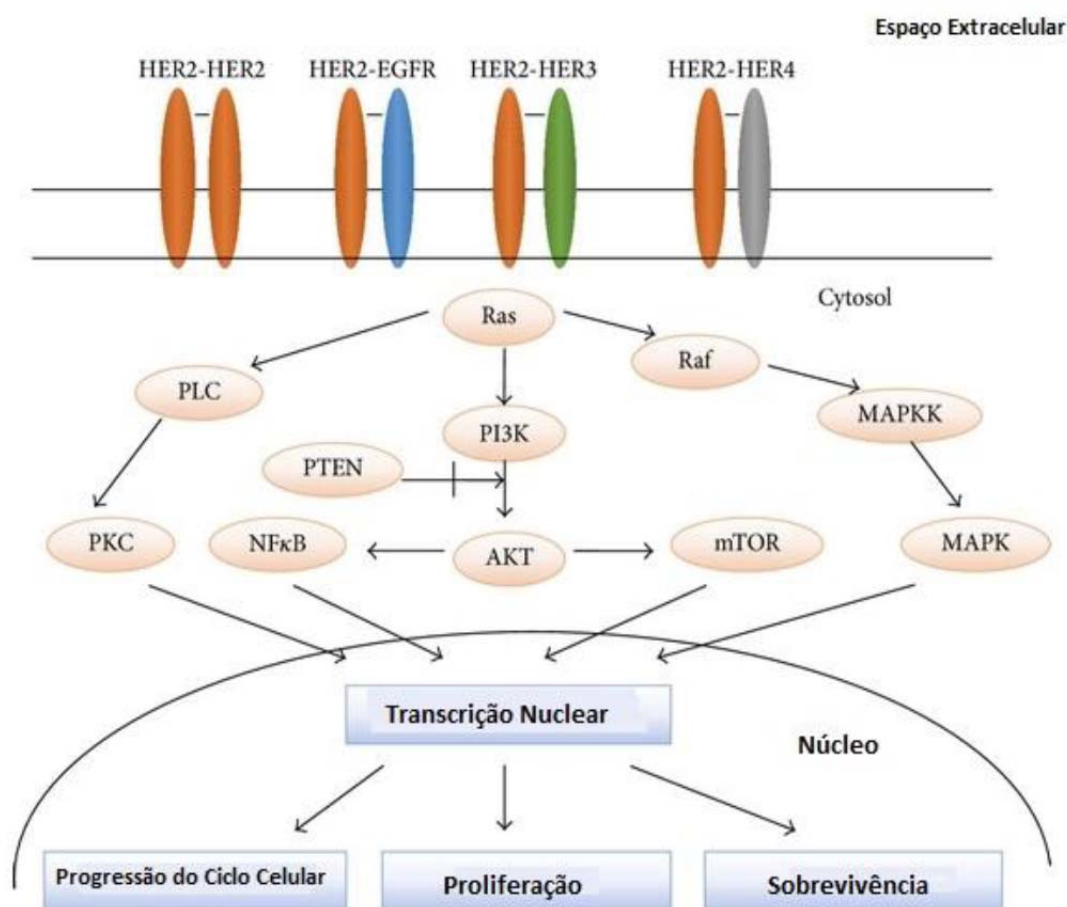
Os receptores ligados à quinase (RTK) fazem parte do grupo III. No organismo humano, são conhecidos cerca de 58 RTK, divididos em 20 subfamílias, com arquitetura molecular semelhante, respondendo principalmente a mediadores protéicos. Possuem três regiões distintas: um domínio extracelular que serve como âncora para um ligante específico, um domínio transmembranar e um domínio tirosina-quinase citoplasmático, bem como sequências enzimáticas envolvidas com a transdução do sinal intracelular, que também podem apresentar atividade proteína quinase (LEITE et al. 2012).

O contato entre o ligante (FC) e o seu receptor na forma monomérica, ativa o processo de dimerização, resultando na fosforilação do domínio intracelular, pela reação de ATP e resíduos de tirosina, seguida da fosforilação de proteínas-alvo que apresentem o domínio SH2, sítio de reconhecimento para as fosfotirosinas. A fosforilação intracelular dá início a uma série de eventos citoplasmáticos originando respostas celulares diversas, constituindo as vias de sinalização (CANTLEY et al. 2002; VIVANCO et al 2002).

As principais vias de sinalização dos fatores de crescimento envolvem a via PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína quinase) e a via Ras/Raf/MEK/MAPK, atuando na expressão gênica e inibição da apoptose. Estas vias interagem entre si, regulando o crescimento normal da célula e a carcinogênese. Neoplasias podem exibir mutação ou hiperexpressão de alguns de seus componentes, como por exemplo, Ras, B-Raf, PI3K, PTEN e Akt (LEMMON et al. 2010).

Os receptores tirosina-quinase também podem ser estimulados por outras vias de sinalização como estresse celular, ativação de receptores de citocinas/proteínas de adesão, receptores acoplados a proteína G, ou por receptores ativados por canais de cálcio voltagem-dependentes; esse processo é conhecido como transativação ou cross-talk (MORENO-BUENO et al. 2005; LEMMON et al. 2010).

A família do receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER) possui quatro membros: EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2/neu-2, HER3/ErbB-3, e HER4/ErbB-4. Apresentam um sítio de ligação extracelular rico em cisteína, um segmento transmembranar e um domínio intracelular com atividade tirosinaquinase catalítica. Alterações na via constituída por HER/PTEN/Akt podem ocorrer em várias neoplasias, constituindo-se uma importante opção de alvo terapêutico (OLAYIOYE et al. 2000; IQBAL et al. 2014) (Figura 1).



Fonte: Adaptada de IQBAL et al. (2014).

Legenda: Esquematização das vias de sinalização downstream PI3K/AKT e Raf/MAPK que são ativadas por receptores HER. HER, receptor de fator de crescimento epidérmico humano; PLC, fosfolipase C; PKC, protein quinase C; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PTEN, fosfatase e homolog de tensina; NFκB factor nuclear κB; mTOR, alvo de rapamicina em mamífero; MAPK, proteinoquinase ativada por mitógeno; MAPKK, MAPK quinase.

Figura 1 – Vias de sinalização PI3k/AKT e Raf/MAPK ativadas pelos receptores HER.

Os receptores HER podem apresentar alterações tais como superexpressão, superprodução de ligantes, superexpressão do receptor mais superprodução de ligantes, dando origem a uma alça autócrina, e mutações que levam à ativação constitutiva do domínio tirosina-quinase ou defeito na internalização com consequente não desativação dos receptores, mecanismo conhecido como downregulation. Alterações nesta via têm sido observadas em câncer da mama, ovário, pulmão e cólon (ROSKOSKI et al. 2004).

Desde o advento de drogas alvo-específicas, como Cetuximab e Herceptin, estudos sobre as mutações de EGFR e c-erbB2 têm se avolumados, embora ainda sejam poucos os estudos envolvendo c-erbB-3/4. A amplificação ou superexpressão de proteínas da família ErbB é associada a mau prognóstico em diversas neoplasias, como mama, estômago, esôfago e cólon, mas ainda é escasso o conhecimento sobre o comportamento dessas moléculas no CaPe e a participação de outros fatores associados que podem interferir nesta regulação, como a infecção pelo vírus HPV. Imunoexpressão de EGFR, HER3 e HER4, ao contrário de Her-2, parece estar associada a carcinogênese peniana, e as neoplasias associadas ao HPV tendem a expressar mais significativamente EGFR, com implicações na via de regulação AKT (upstream) (BAIOCCHI et al. 2009; SATO-KUWABARA et al. 2009; LAVENS et al. 2010; STANKIEWICZ et al. 2011; DI LORENZO et al. 2015).

O gene KRAS é um membro da família de proto-oncogene RAS, e codifica uma proteína que é um componente importante da via de

sinalização EGFR. Mutações neste gene também são observadas em diferentes tumores e está relacionado a uma resposta pobre e resistência a terapias anti-EGFR. BRAF também faz parte da via de sinalização EGFR/RAS/RAF, codificando uma proteína relacionada ao crescimento celular, apoptose e transformação maligna, sendo observadas mutações em vários tumores como melanoma, câncer colorretal e outros. A superexpressão ou ativação destes genes são observadas em vários tipos de tumores (KIMURA et al. 2003; WEBER et al. 2003; FANG e RICHARDSON 2005; BIDINOTTO et al. 2016). Tem-se demonstrado que KRAS e BRAF representam uma promissora oportunidade de desenvolvimento de novas drogas contra o câncer, que podem ser designadas para atuar em alvos terapêuticos (STENZEL et al. 2001).

Desta forma, detectar o envolvimento da via de sinalização EGFR/RAS/RAF através da pesquisa de mutação em KRAS, BRAF e EGFR, e expressão de *cerbB2* no câncer de pênis pode acrescentar informações ao entendimento do comportamento biológico e características regionais dessa neoplasia.

O presente estudo é parte integrante de um projeto nacional - Estudo Brasileiro de Carcinoma de Pênis, coordenado pelo A.C.Camargo Cancer Center e visa conhecer as peculiaridades regionais das múltiplas variantes morfológicas do CaPe, sua importância no prognóstico e tratamento dos pacientes, e traçar um perfil molecular dessa condição.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a frequência de mutações dos genes KRAS, BRAF e EGFR em câncer de pênis em uma população do nordeste do Brasil, e correlacionar com aspectos clínicos e epidemiológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os subtipos de carcinoma de pênis na população do estado do Ceará, relacionando-os com variáveis clínicopatológicas e alterações moleculares nos genes BRAF, KRAS e EGFR;
- Identificar os subtipos de carcinomas de pênis presentes no estado do Ceará e estabelecer uma relação dos subtipos de CaPe com aspectos epidemiológicos;
- Identificar a associação de metástases linfonodais, sobrevida livre de doença e sobrevida global com a validação do Índice Prognósticos de Escores;
- Contribuir para melhor compreensão da etiopatogenia molecular e vias de controle do CaPe, relacionados aos genes KRAS, BRAF e EGFR;
- Verificar a imunoexpressão da proteína c-erbB-2 no carcinoma de células escamosas do pênis por imunohistoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, de coorte retrospectivo, com amostragem intencional.

3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

Pacientes portadores de câncer de pênis atendidos no Serviço de Urologia do Hospital Haroldo Juaçaba/ICC do período de 2002 a 2016.

3.3 PACIENTES

3.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba com diagnóstico de carcinoma de células escamosas do pênis, submetido a tratamento cirúrgico do tumor primário.
- Presença de material biológico arquivado em bloco de parafina suficiente para extração de DNA sem que haja prejuízo do material restante ou esgotamento do bloco de parafina.

3.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com impossibilidade de coletar informações clínico-patológicas adequadas;
- Pacientes que apresentem mais de uma neoplasia maligna;
- Pacientes cuja amostra biológica não contenha quantidade de DNA suficiente após a extração para realização de estudo de biologia molecular;
- Pacientes que apresentaram DNA extraído invalidado em pelo menos dois testes moleculares.

3.3.3 Coleta de dados do protocolo de estudo de carcinoma de pênis do A.C.Camargo Cancer Center (Anexo 1).

Foram revisados 108 prontuários de pacientes do serviço de Urologia do Hospital Haroldo Juaçaba, no período compreendido entre 2004 e 2016. Foram coletados dados referentes às variáveis independentes relacionadas a aspectos epidemiológicos, estadiamento patológico, estado linfonodal e margens cirúrgicas; tendo como desfecho (variável dependente) as sobrevidas global e livres de doença.

As variáveis foram inseridas em planilha do EXCEL e SPSS versão 21.0.

3.3.4 Revisão anatomopatológica

As lâminas histológicas coradas por HE (hematoxilina-eosina) provenientes de lesões de pacientes com CEC de pênis acompanhados no Hospital Haroldo Juaçaba foram revisadas por dois patologistas com ênfase nas variáveis: localização anatômica, classificação adequada dos subtipos histológicos, grau de diferenciação celular, presença de invasão perineural e vascular, profundidade da infiltração, estadiamento patológico, estado linfonodal e presença de coilócitos, dentre outros presentes no Protocolo de Estudo de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo (Anexo2). Os casos foram adaptados ao estadiamento patológico mais recente (EDGE et al. 2010).

3.4 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE c-erbB-2

Secções histológicas de carcinomas de pênis fixados em formol e incluídos em parafina foram montadas em lâminas silanizadas para o estudo imunoistoquímico. Todas as reações foram realizadas de forma automatizada no *Auto Stainer* (DAKO™). Foi utilizado o anticorpo *Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein* (DAKO™). A etapa de reativação antigênica foi processada no sistema PT-Link (DAKO™) em pH 6,0 e utilizado o sistema de amplificação FLEX Plus (DAKO™). Os tempos de incubação seguiram indicações do fabricante. A análise das lâminas foi realizada de forma visual utilizando o sistema de escore padronizado para interpretação, considerando os seguintes escores aplicáveis para carcinoma

mamário, preconizados pelo Colégio Americano de Patologia (CAP), conforme figura abaixo:

<i>Escore</i>	<i>Expressão da proteína</i>	<i>Padrão de imunomarcacão das células neoplásicas</i>
0	Negativa	Marcação ausente ou raramente perceptível em menos de 10% das células neoplásicas
1+	Negativa	Marcação raramente perceptível em mais de 10 % das células
2+	Indeterminada	Marcação fraca ou moderada em mais de 10% das células ou intensa e completa em menos de 10%
3+	Positiva	Marcação completa e forte da membrana em mais de 10% das células

Fonte: Adaptado de WOLFF et al. (2014)

Figura 2 - Padrão de imunomarcacão e escores utilizados para avaliação de expressão dec-erbB-2

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA PARA BIOLOGIA MOLECULAR

A extração de DNA oriundo de pacientes portadores de carcinoma de pênis foi obtida a partir de cortes dos tecidos fixados em formalina e conservados em parafina de acordo com instruções do kitCobas DNA SamplePreparation (Roche Diagnóstica) e foi realizada nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Haroldo Juaçaba.

As áreas tumorais de carcinoma foram demarcadas porpatologista em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. A quantidade de

células neoplásicas recomendada nos tecidos selecionados deve ser maior do que 70% das células totais. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit DNA Sample preparationkit (Roche Diagnostica, USA) de acordo com especificações do fabricante. Para a macrodissecção, foram realizados cerca de 8 cortes de 5µm de espessura. As lâminas contendo os cortes foram lavadas em xilol (5 min) e etanol a 100% (5 min) a fim de remover a parafina presente na amostra. Posteriormente, foram realizadas as raspagens da área tumoral e coletadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo 180 µL de tampão TLB e 70 µL de proteinase K, com incubações sucessivas a 56°C por 1 h e 90°C por 1 h, nos termoblocos eppendorf modelo thermo mixer compact em agitação constante a 300 rpm.

Em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão PBB (DNA binding buffer). A solução foi homogeneizada por agitação vigorosa e incubada a 28°C por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de isopropanol. Todo o conteúdo foi então transferido para o Cobas 4800 testfiltertubecom um tubo coletor acoplado, centrifugado a 8.000 RPM, com posterior descarte do tubo coletor. A coluna foi acoplada a um novo tubo coletor e adicionado a 500 µL de WBI seguido de centrifugação a 8.000x g por 1min. Adicionalmente, acrescentou-se 500 µL de WBII à coluna e centrifugado a 8.000xg por 1min, bem como centrifugação a 20.000 RPM para secagem completa da coluna e que foi transferida para novo tubo coletor com adição de 100 µL de tampão de eluição (DNA EB) com incubação de 10min a 28°C. O DNA extraído foi coletado após centrifugação a 8.000 RPM.

O gDNA extraído foi avaliado quanto à quantidade e qualidade pela

leitura do DNA final por leitura em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. A solução DNA EB foi utilizada como o branco do equipamento. A leitura da absorbância 260 nm fornece a quantidade total de rendimento de ácido nucleico. A razão das leituras 260/280 nm (A_{260}/A_{280}) foi utilizada para verificar a qualidade do DNA obtido de cada amostra. As amostras que obtiveram razão entre 1,8 e 2,0 são consideradas livres de contaminação.

Em média, são necessárias 2 leituras consistentes para determinação da quantidade de DNA. As duas medições devem estar a $\pm 10\%$ uma da outra quando as leituras de concentração de DNA forem $\geq 20,0$ ng/ μ l. Para leituras de concentração de DNA $< 20,0$ ng/ μ l, as duas medições devem estar dentro de ± 2 ng/ μ l. Se as duas medições não estiverem dentro desses parâmetros, devem ser efetuadas outras 2 leituras até os requisitos serem satisfeitos para proceder o cálculo da média destas duas novas medições. O gDNA obtido de cada amostra foi mantido a -20°C até a realização dos testes moleculares.

3.5.1 Rastreamento de mutação no gene KRAS

Foram avaliadas 19 mutações nos códons 12 13 e 61 do gene KRAS pela técnica de TaqMelt® por PCR em tempo real, de acordo com o *kit Cobas® KRAS Mutation Test* (Roche Diagnóstica) (QIAGEN 2013a).

3.5.2 Rastreamento de mutação no gene BRAF

Foi avaliada a mutação V600E no éxon 15 (códon 600) do gene BRAF pela tecnologia de TaqMan por PCR em tempo real, de acordo com as instruções do kit *Cobas®4800 BRAF V600 Mutation Test* (Roche Diagnóstica).

3.5.3 Rastreamento de mutação no gene EGFR

Foram rastreadas 41 mutações nos éxons 18 19 20 e 21 do gene EGFR humano pela tecnologia de PCR Alelo-Específico (AS-qPCR) em tempo real. Foi utilizado o kit diagnóstico *in vitro Cobas EGFR Mutation Test* (Roche Diagnóstica) (QIAGEN 2013b).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos através da frequência absoluta e relativa de cada variável. Utilizou-se o teste do qui-quadrado para analisar os fatores que influenciaram a prevalência de recidiva de câncer de pênis. Para os dados com associação significativa, traçaram-se as curvas de Kaplan Meier para cálculo do tempo médio livre de doença, as quais foram analisadas por meio do teste de *Long Rank Mantel Cox*.

Todas as análises foram realizadas no software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 21.0 para Windows adotando o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Pacientes que não compareceram às consultas ou sem informações por um período superior a um ano para retorno serão considerados perdidos

de seguimento na data da última informação. Esses pacientes contribuirão para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto possui as seguintes aprovações:

Protocolo CAAE: 18242113.0.0000.5528

Protocolo Interno ECO/ ICC: 017/2013

3.8 FINANCIAMENTO

FUNCAP/PPSUS: 5084342/2013

4 RESULTADOS

4.1 DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS

De 108 pacientes incluídos no estudo, a idade média foi de $64,5 \pm 16,2$ (18 - 103) anos e a mediana de 63 anos. A maior incidência foi de pacientes com idade entre 50 e 80 anos (63,9%). Quanto à procedência, houve equilíbrio em relação aos pacientes provenientes do interior e da capital. A etnia parda foi maioria (79,6%). Vínculo afetivo à época do diagnóstico esteve presente em 88 pacientes (81,5%) como observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Frequências absoluta e relativa de média de idade, procedência, etnia e vínculo de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC

Idade	64,5 ± 16,2 (18 - 103) anos
Menos de 50 anos	18 (16,7%)
Entre 50 e 80 anos	69 (63,9%)
80 ou mais	21 (19,4%)
Procedência	
Interior	53 (49,1%)
Capital/Zona metropolitana	55 (50,9%)
Estado civil	
Sem histórico de vínculo	20 (18,5%)
Com histórico de vínculo	88 (81,5%)
Etnia	
Branco	22 (20,4%)
Pardo	86 (79,6%)
TOTAL	108 (100%)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano

4.2 DADOS CIRÚRGICOS

O procedimento cirúrgico mais realizado foi a amputação peniana parcial (75,9%), seguida por amputação peniana total (17,6%). Em 03 pacientes foi realizada a emasculação (Tabela 2).

Tabela 2 - Tipos de cirurgia realizada na primeira abordagem de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC

Cirurgia	
Amputação parcial	82 (75,9%)
Amputação total	19 (17,6%)
Emasculação	3 (2,8%)
Postectomia ampliada	3 (2,8%)
Exérese da lesão	1 (0,9%)
TOTAL	108 (100%)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano

Em cerca de 50,9% dos pacientes houve abordagem linfonodal. Esvaziamento inguinal (24,0%) e inguinoilíaco (22,2%) foram as intervenções cirúrgicas mais frequentes. Pesquisa de linfonodo sentinela foi realizada em 3 pacientes (2,7%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequências absoluta e relativa do tipo de abordagem linfonodal de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC

Esvaziamento linfonodal		
Não	53	(49,1 %)
Sim	55	(50,9%)
- Inguinal	26	(24,0%)
- Inguinoilíaco	24	(22,2%)
- Linfonodo sentinela	3	(2,7%)
- Pélvica	1	(0,9%)
- Pélvica estendida	1	(0,9%)
TOTAL	108	(100%)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano

4.3 DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

De acordo com o estadiamento patológico realizado 31 pacientes (29,7%) se apresentaram como pT1; 43 (39,8%) como pT2; 30 (27,8%) como pT3 e 3 (2,8%) como pT4 (Tabela 4) (SOBIN et al. 2012).

Quanto ao envolvimento linfonodal (pN), a maioria dos pacientes (50,9%) não foi avaliada pela ausência de abordagem linfonodal. Porém, dentre os 55 pacientes em que foi realizado estudo de linfonodo, 41,8% deles não apresentaram neoplasia, estágio pN0 (23) e 47,2% pN3. N1 e N2, contaram respectivamente 4 e 2 pacientes, representando 7,2% e 3,6% de 55 pacientes (Tabela 4).

A avaliação do comprometimento de margem cirúrgica mostrou que 87% das ressecções estavam livres de neoplasia (Tabela 4).

Com relação ao tamanho do tumor, predominaram, ainda nesta amostra de 108 pacientes, tumores compreendidos entre 2,1 e 4,0 cm no maior diâmetro (47,2%), e tumores acima de 4 cm (40,7%). Em 13 pacientes (12,1%) a medida do tumor era inferior a 2,0 centímetros. O tamanho médio da lesão foi de 4,12 centímetros, com desvio padrão de 2,5 e variando entre o mínimo de 0,8 e o máximo de 20 centímetros, e mediana de 3,7. Em relação ao padrão de crescimento, predominaram os padrões vertical, com 47 pacientes (43,5%) e verruciforme com 33 (30,6%). Três (2,8%) pacientes apresentaram padrão de crescimento superficial; O restante, que corresponde a 25 pacientes (23,1%), não teve seu padrão de crescimento determinado (Tabela 5).

Quanto à invasividade, predominaram tumores que não invadiam uretra (70,4%), não invadiam órgãos adjacentes (97,2%), e sem invasão vascular (58,3%) ou neural (60,2%). Quando infiltravam, predominou a infiltração de no máximo dois centímetros (65,7%); já as bordas de invasão geralmente se deram por grandes blocos (38,9%), pequenos blocos (39,8%) ou ambos (20,4%) (Tabela 5 e Figura 3).

Tabela 4 - Estadio pT, pN e comprometimento de margem cirúrgica de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC

pT	
T1	31 (28,7%)
T2	43 (39,8%)
T3	30 (27,8%)
T4	3 (2,8%)
Tx	1 (0,9%)
pN	
N0	23 (21,3%)
N1	4 (3,7%)
N2	2 (1,9%)
N3	26 (24,0%)
Nx	53 (49,1%)
Comprometimento de margem	
Não	94 (87,0%)
Sim	14 (13,0%)
TOTAL	108 (100%)

Fonte: Adaptado de SOBIN et al. (2012)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano

Tabela 5 - Características relacionadas ao tumor de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC

Tamanho do tumor	4,12 ± 2,5 (0,2 - 20) centímetros
Até 1,0 cm	6 (5,6%)
1,1 a 2,0 cm	7 (6,5%)
2,1 a 4,0 cm	51 (47,2%)
Acima de 4,0 cm	44 (40,7%)
Padrão de crescimento	
Superficial	3 (2,8%)
Vertical	47 (43,5%)
Verruciforme	33 (30,6%)
Não classificado	25 (23,1%)
Infiltração	
Até 2 cm	71 (65,7%)
Mais de 2 cm	37 (34,3%)
Bordas da invasão	
Grandes blocos	42 (38,9%)
Pequenos blocos	43 (39,8%)
Células isoladas	1 (0,9%)
Misto	22 (20,4%)
Invasão vascular	
Não	63 (58,3%)
Sim	45 (41,7%)
Invasão neural	
Não	65 (60,2%)
Sim	43 (39,8%)
Invasão uretra	
Não	76 (70,4%)
Sim	32 (29,6%)
Invasão órgão adjacente	
Não	105 (97,2%)
Sim	3 (2,8%)
TOTAL	108 (100%)

Legenda: tamanho, padrão de crescimento, bordas de crescimento, invasão vascular, perineural, uretral ou de órgão adjacente.

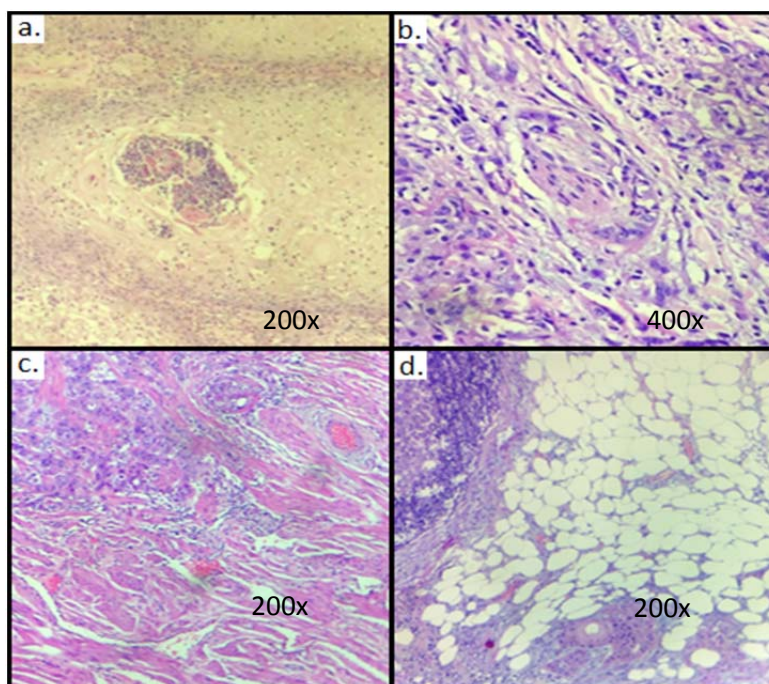


Figura 3 - Reprodução de lâminas coradas por HE de CEC de pênis de pacientes incluídos no estudo: (a) invasão vascular (magnitude original de 200x)(b) invasão perineural (magnitude original de 400x)(c) invasão de corpo esponjoso (magnitude original de 200x) (d) metástase linfonodal com extensão extracapsular (magnitude original de 200x).

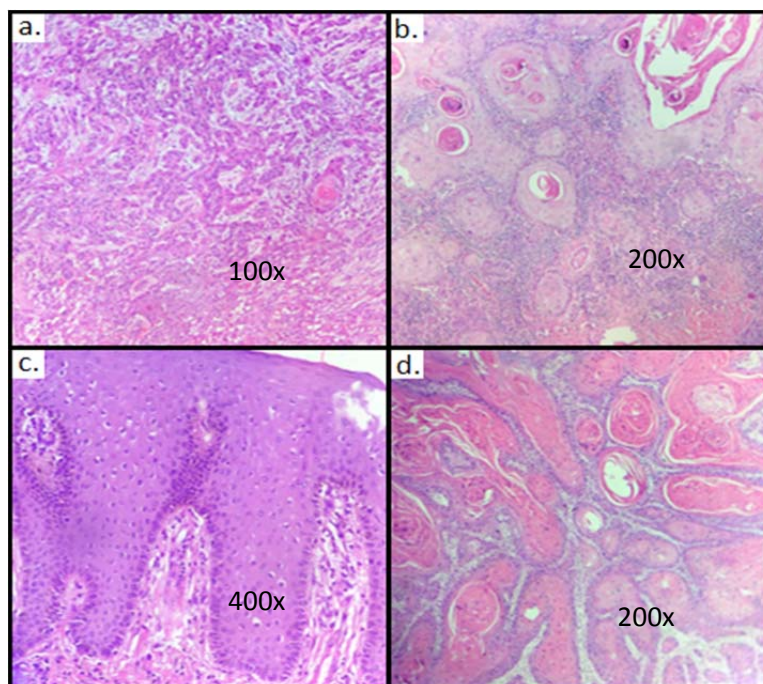


Figura 4 - Carcinoma de células escamosas de pênis de pacientes incluídos no estudo: (a) bordas de invasão em pequenos blocos(magnitude original de 100x) (b) bordas de invasão em grandes blocos (magnitude original de 200x) (c) coilócitos (magnitude original de 400x)(d) ceratinização (magnitude original de 200x)

Todos os pacientes apresentavam carcinoma espinocelular de acordo com os critérios de inclusão previamente estabelecidos, sendo o subtipo usual o mais frequente (69,4%), seguido pelo condilomatoso (18,5%). No entanto, os subtipos, verrucoso e basaloide também foram evidenciados respectivamente em 6,5%,e 2,8% dos pacientes. Os subtipos papilífero, sarcomatoide, pseudohiperplásico e cuniculatum corresponderam, cada um, a 0,9% da amostra. Quanto ao grau de diferenciação da neoplasia, 64,8% dos tumores mostrou grau histológico moderadamente diferenciado, enquanto apenas 6,5% dos tumores foram pouco diferenciado (Tabela 6 e Figura 5).

Tabela 6 - Distribuição de acordo com o subtipo e diferenciação histológica de pacientes com carcinoma de células escamosas do pênis do ICC

<i>Carcinoma Espinocelular subtipo</i>	
Usual	74 (69,4%)
Condilomatoso	20 (18,5%)
Verrucoso	7 (6,5%)
Basaloide	3 (2,8%)
Papilífero	1 (0,9%)
Sarcomatoide	1 (0,9%)
Pseudohiperplásico	1 (0,9%)
Cuniculatum	1 (0,9%)
Grau Histológico	
Bem diferenciado	31 (28,7)
Moderadamente diferenciado	70 (64,8%)
Pouco diferenciado	7 (6,5%)
TOTAL	108 (100%)

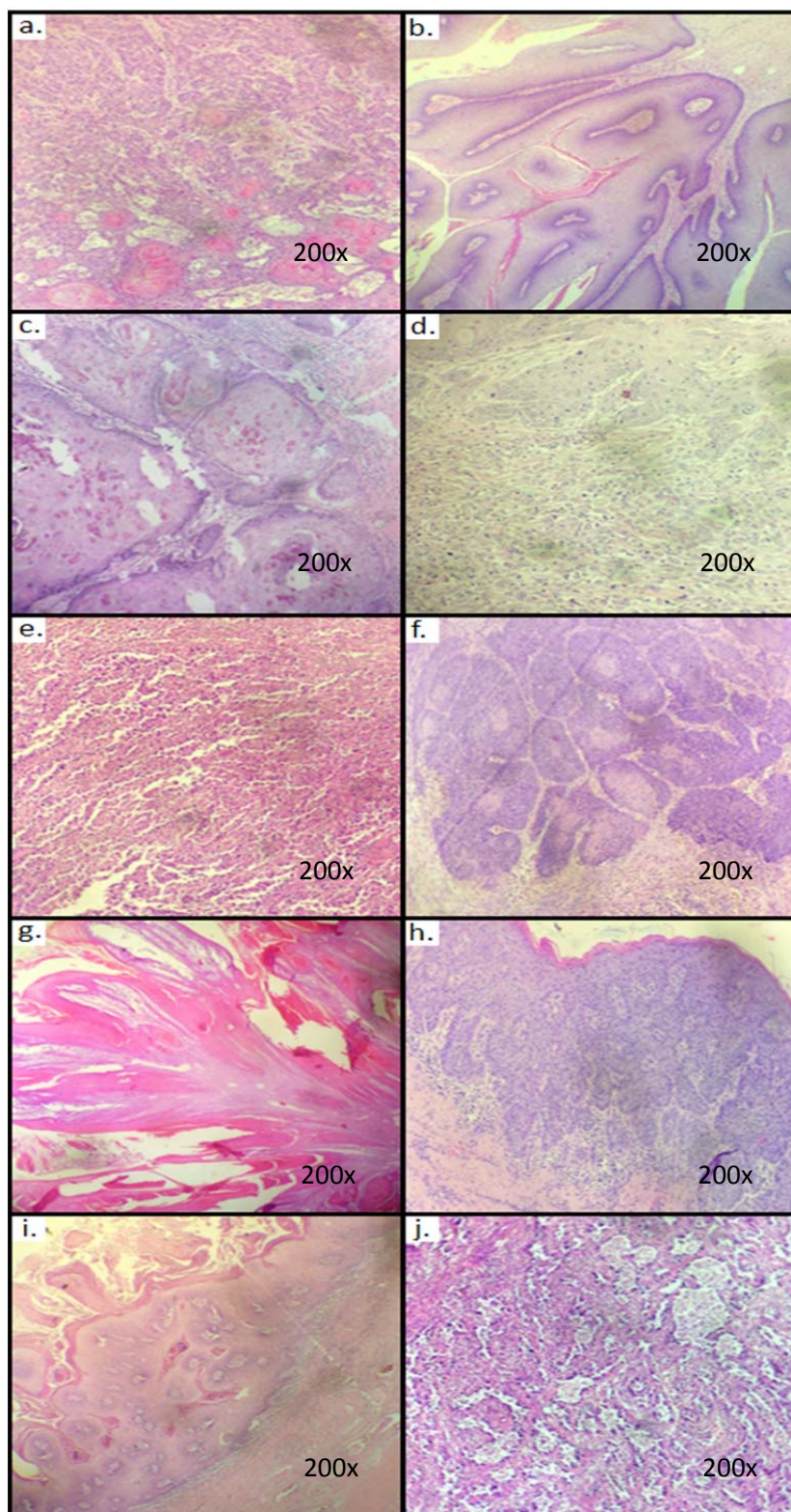


Figura 5 - Reprodução de lâminas de HE de subtipos de carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes incluídos no estudo (a) usual (b) condilomatoso (c) cuniculatum (d)misto (e) sarcomatoide (f) basaloide (g) papilar (h) pseudohiperplásico (i) verrucoso (j) pseudoglandular (magnitude original de 200x)

Quanto ao Índice Prognóstico de Escores, a maior parte dos pacientes (50,9%) somaram escores entre 5 e 7, o que os classificou em alto risco; 23 pacientes (21,3%) se classificaram no escore de risco intermediário, e outros 29 (26,9%) no de baixo risco (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição de carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC em relação ao Índice Prognóstico de Escores

Índice Prognóstico de Escores	
2 - 3 (baixo risco)	29 (26,9%)
4 (risco intermediário)	23 (21,3%)
5 - 7 (alto risco)	55 (50,9%)
Indeterminado	1 (0,9%)
TOTAL	108 (100%)

Fonte: Adaptado de CHAUX et al. (2009).

Legenda: Índice Prognóstico de Escores, é a soma da pontuação relacionadas ao grau histológico (grau 1:1; grau 2:2 e grau 3:3) invasão tumoral máxima (lâmina própria :1; corpo esponjoso/dartos :2; corpo cavernoso/prepúcio :3) e invasão prineural (presente:1; ausente :0); baixo risco: escore 2-3; risco intermediário :4; alto risco: 5-7;

Alterações celulares interpretadas como coilocitose foram observadas em 63,9% dos pacientes; em 16,7% não foi possível demonstrar tais alterações à histologia (Tabela 8)

Tabela 8 - Frequência de coilocitose em lâminas de HE em carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC

Coilócitos	
Ausente	21 (19,4%)
Presente	69 (63,9%)
Indeterminado	18 (16,7%)
TOTAL	108 (100%)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano; HE:coloração de hematoxilina-eosina

A imunodeteção de c-erbB-2 nas células neoplásicas foi negativa (escores 0/1) em 97,2% dos pacientes (105). Apenas um paciente apresentou positividade (escore 3+) e dois foram classificados como indeterminado/duvidoso(escore 2+) (Tabela 9 e Figura 6).

Tabela 9 - Frequência da expressão de c-erbB-2 por imunohistoquímica em carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC

c-erbB-2	
Negativo (0/1+)	105 (97,2%)
Indeterminado/ duvidoso (2+)	2 (1,9%)
Positivo (3+)	1 (0,9%)
TOTAL	108 (100%)

Fonte: Adaptado de WOLFF et al. (2014)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano;

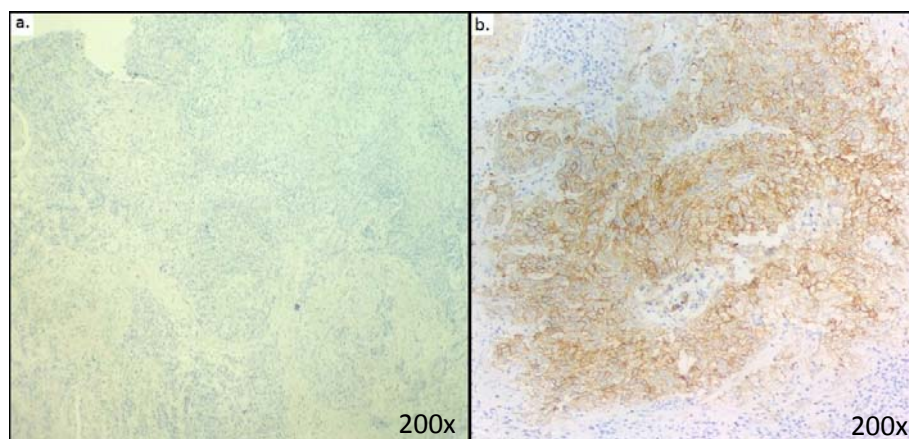


Figura 6 - Reação de imunohistoquímica com anticorpo policlonal c-erbB-2 DAKO®, magnitude de 200: (a) negativo, escore (0). (b) positivo escore (3+) nas amostras de CEC de pênis de pacientes incluídos no estudo.

4.4 DADOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

A análise mutacional mostrou que somente um paciente apresentou mutação detectada no gene KRAS (códon 12 e 13) enquanto os outros 92 pacientes com DNA válido para o teste se mostraram negativos para as mutações pesquisadas. Não foram detectadas mutações no gene BRAF em amostras de DNA válido de 98 pacientes. Também não foram detectadas mutações para o gene EGFR em amostras de DNA válido de 100 pacientes. (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência de mutações nos genes BRAF, EGFR e KRAS avaliadas por RT-PCR em carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC

BRAF	
Mutação não detectada	98 (90,7%)
DNA inválido	10 (9,3%)
EGFR	
Mutação não detectada	100 (92,6%)
DNA inválido	8 (7,4%)
KRAS	
Mutação detectada	1 (0,9%)
Mutação não detectada	92 (85,2%)
DNA inválido	15 (13,9%)
TOTAL	108 (100%)

Legenda: BRAF: proto-oncogene B-raf; EGFR: gene do fator de receptor de crescimento epidérmico; KRAS: proto-oncogene KRAS; CaPe: carcinoma peniano; RT-PCR: reação de polimerase em cadeia em tempo real.

4.5 DADOS DE SEGUIMENTO

A maioria (82,4%) dos pacientes não recidivou (Tabela 11). Todavia, importante parcela de pacientes não compareceu à consulta há pelo menos um ano (58,3%), sendo portanto considerada como perda de seguimento (Tabela 12).

Tabela 11 - Frequência de recidiva de carcinoma de células escamosas do pênis de pacientes do ICC

<i>Recidiva da neoplasia</i>	
Não	89 (82,4%)
Sim	19 (17,6%)
TOTAL	108 (100%)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano

Tabela 12 - Frequência da perda de seguimento de pacientes do ICC com carcinoma de células escamosas do pênis

<i>Perdeu seguimento</i>	
Não	45 (41,7%)
Sim	63 (58,3%)
TOTAL	108 (100%)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano

4.6 DADOS E ANÁLISES INFERENCIAIS

A Tabela 13 mostra a associação entre variáveis clínico-cirúrgicas e o carcinoma de células escamosas de subtipo usual cujo cruzamento mostrou p estatisticamente significativo (inferior a 0,05). As variáveis que

apresentaram associação negativa (*odds ratio* < 1) foram, em ordem decrescente de proteção, estadiamento patológico (pT1), invasão até a lâmina própria, grau histológico (bem diferenciado) e idade maior que 70 anos. Já as variáveis bordas de invasão (pequenos blocos), comprometimento de margens, invasão até corpo esponjoso, IPE (alto risco) e infiltração apresentaram associação positiva (*OR* > 1) com o subtipo histológico usual do CEC de pênis.

Tabela 13 - Associação entre carcinoma de células escamosas do pênis de subtipo usual e variáveis clínicopatológicas (idade, estadiamento patológico, IPE, margens cirúrgicas, invasividade, grau histológico e bordas de invasão microscópica) de pacientes do ICC

	<i>p</i>	<i>OR</i>
Estadiamentopatológico pT1	0,005	0,266 (0,109 - 0,962)
Invasão até lâmina própria	0,006	0,293 (0,122 - 0,706)
Grau histológico bem diferenciado	0,026	0,325 (0,135 - 0,785)
Idade maior que 70 anos	0,032	0,417 (0,180 - 0,962)
Infiltração (cm) *	0,045	2,476 (0,954 - 6,428)
Índice prognóstico de escores de alto risco	0,012	2,933 (1,242 - 6,930)
Invasão de corpo esponjoso	0,002	5,524 (1,763 - 17,30)
Margens comprometidas	0,023	6,710 (0,804 - 50,61)
Bordas de invasão em pequenos blocos	0,001	7,092 (2,481 - 20,27)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano

IPE: Índice Prognóstico de Escores

Na Tabela 14, são descritas as variáveis que demonstraram correlação estatisticamente significativa com metástase linfonodal. São elas estadiamento patológico (pT1) em associação negativa, e invasão perineural (presente), IPE (alto risco) e invasão vascular (presente) em associação positiva (*OR* > 1).

Tabela 14 - Associação entre metástase linfonodal e variáveis clínico patológicas (estadiamento patológico, IPE, invasão perineural e vascular) de pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis

	<i>p</i>	<i>OR</i>
Estadiamento patológico pT1	0,011	0,172 (0,038 - 0,785)
Invasão perineural presente	0,017	3,333 (1,299 - 8,557)
Índice prognóstico de escores de alto risco	0,007	3,730 (1,345 - 10,34)
Invasão vascular presente	0,002	4,857 (1,804 - 13,07)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano
IPE: Índice Prognóstico de Escores

A Tabela 15 mostra a associação entre grau histológico (G1, baixo grau) com variáveis clínico-cirúrgicas significativas ($p < 0,05$). As variáveis que apresentaram associação negativa (*odds ratio* < 1) foram, em ordem decrescente de proteção, invasão vascular (presente), invasão perineural (presente), metástase linfonodal (pN+), realização de esvaziamento linfonodal, invasão até corpo cavernoso, invasão até corpo esponjoso e tamanho do tumor maior ou igual a 4cm. Já presença de coilocitos, invasão até lâmina própria, estadiamento patológico (pT1) apresentaram associação positiva ($OR > 1$).

Tabela 15 - Associação do grau histológico G1 (baixo grau) e das variáveis clínico cirúrgicas: estadiamento patológico, abordagem linfonodal, metástase linfonodal, tamanho do tumor, invasão de lâmina própria, corpo esponjoso ou corpo cavernoso, coilocitose, invasão perineural e vascular) de pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis

	<i>p</i>	<i>OR</i>
Invasão vascular presente	0,001	0,025 (0,003 - 0,193)
Invasão perineural presente	0,001	0,028 (0,004 - 0,124)
Metástase linfonodal (pN+)	0,034	0,099 (0,011 - 0,896)
Realizou esvaziamento linfonodal	0,001	0,176 (0,067 - 0,460)
Invasão de corpo cavernoso	0,009	0,267 (0,092 - 0,770)
Invasão de corpo esponjoso	0,023	0,297 (0,103 - 0,859)
Tamanho do tumor maior ou igual a 4cm	0,045	0,396 (0,158 - 0,995)
Índice prognóstico de escores (alto risco)	0,001	0,423 (0,308 - 0,581)
Coilocitos presentes	0,016	5,744 (1,236 - 26,69)
Invasão até lâmina própria	0,001	10,83 (4,076 - 28,79)
Estadiamento pT1	0,001	10,90 (4,119 - 28,89)

Legenda: CaPe: carcinoma peniano G1, pT1, N(+)

A Tabela 16 mostra a associação entre estadiamento patológico T (pT1) com as variáveis significativas ($p < 0,05$). Aquelas cuja correlação estatística foi negativa (*odds ratio* < 1) foram, em ordem decrescente de proteção, realização de esvaziamento linfonodal, invasão perineural (presente), invasão vascular (presente), tamanho do tumor (maior que 4cm), Localização do tumor, (base do pênis), invasão até corpo cavernoso, invasão até corpo esponjoso e tamanho do tumor maior ou igual a 4cm. Já as bordas de invasão (pequenos blocos) e o Índice Prognóstico de Escores (baixo risco) apresentaram em ordem decrescente associação positiva (*OR* > 1).

Tabela 16 - Associações significantes do estágio pT1 em pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis

	<i>p</i>	<i>OR</i>
Índice prognóstico de escores (alto risco)	0,001	0,030 (0,007 - 0,136)
Realizou esvaziamento linfonodal	0,001	0,076 (0,024 - 0,239)
Invasão perineural presente	0,001	0,099 (0,028 - 0,354)
Invasão vascular presente	0,001	0,178 (0,062 - 0,512)
Tamanho do tumor maior que 4,0 cm	0,012	0,315 (0,122 - 0,818)
Tumor localizado na base do pênis	0,041	0,333 (0,112 - 0,989)
Bordas de invasão por grandes blocos	0,002	5,232 (1,824 - 15,00)
Índice prognóstico de escores de baixo risco	0,001	75,00 (19,55 - 287,7)

Legenda: CaPe, pT1

A Tabela 17 descreve a associação entre a Recidiva com as variáveis significativas ($p < 0,05$). Todas as correlações estatísticas foram de associação positiva (*odds ratio* > 1). São elas, em ordem decrescente de proteção, invasão vascular (presente), invasão perineural (presente), Índice Prognóstico de Escores (alto risco) e comprometimento de margens.

Tabela 17 - Associações significantes entre a recidiva e as variáveis anatomopatológicas em pacientes do ICC com carcinoma de células escamosas do pênis

	<i>p</i>	<i>OR</i>
Invasão vascular presente	0,036	2,909 (1,042 - 8,121)
Invasão perineural presente	0,005	4,261 (1,473 - 12,33)
Índice prognóstico de escores de alto risco	0,011	4,500 (1,383 - 14,64)
Margens comprometidas	0,017	4,673 (1,394 - 15,66)

Tabela 18 - Associação entre IPE alto risco e variáveis clínico-cirúrgicas de pacientes do ICC portadores de carcinoma de células escamosas do pênis

	<i>p</i>	<i>OR</i>
Invasão até lâmina própria	0,001	0,028 (0,006 - 0,126)
Estadiamento patológico T (pT1)	0,001	0,030 (0,007 - 0,136)
Bordas de invasão (grandes blocos)	0,001	0,132 (0,050 - 0,345)
Grau histológico (baixo)	0,001	0,423 (0,308 - 0,581)
Tamanho do tumor (superior a 4cm)	0,020	2,558 (1,150 - 5,691)
CEC subtipo usual	0,012	2,933 (1,242 - 6,930)
Metástase linfonodal (pN+)	0,009	3,730 (1,345 - 10,35)
Comprometimento de margens	0,029	4,083 (1,069 - 15,59)
Recidiva	0,008	4,500 (1,383 - 14,64)
Invasão até uretra	0,001	5,357 (2,057 - 13,94)
Realização de esvaziamento linfonodal	0,001	5,532 (2,404 - 12,72)
Padrão de crescimento (vertical)	0,001	7,583 (2,844 - 20,22)
Invasão vascular (presente)	0,001	11,31 (4,414 - 28,96)
Invasão até corpo cavernoso	0,001	14,10 (8,845 - 41,03)
Invasão perineural (presente)	0,001	21,01 (7,100 - 62,18)

A Tabela 18 mostra a associação entre o Índice Prognóstico de Escores (alto risco) com as variáveis cuja correlação foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Aquelas cuja associação foi negativa (*odds ratio* < 1) foram, em ordem decrescente de proteção, invasão até a lâmina própria, estadiamento patológico pT1, bordas de invasão por grandes blocos e baixo grau histológico. Já em relação aos que apresentaram correlação positiva ($OR > 1$), foram em ordem crescente de associação tamanho do tumor superior a 4 centímetros, tipo histológico CEC subtipo usual, presença de metástase linfonodal, comprometimento de margem cirúrgica, recidiva, invasão até a uretra, realização de esvaziamento linfonodal, padrão de

crescimento vertical, presença de invasão vascular, invasão até corpo cavernoso e presença de invasão perineural.

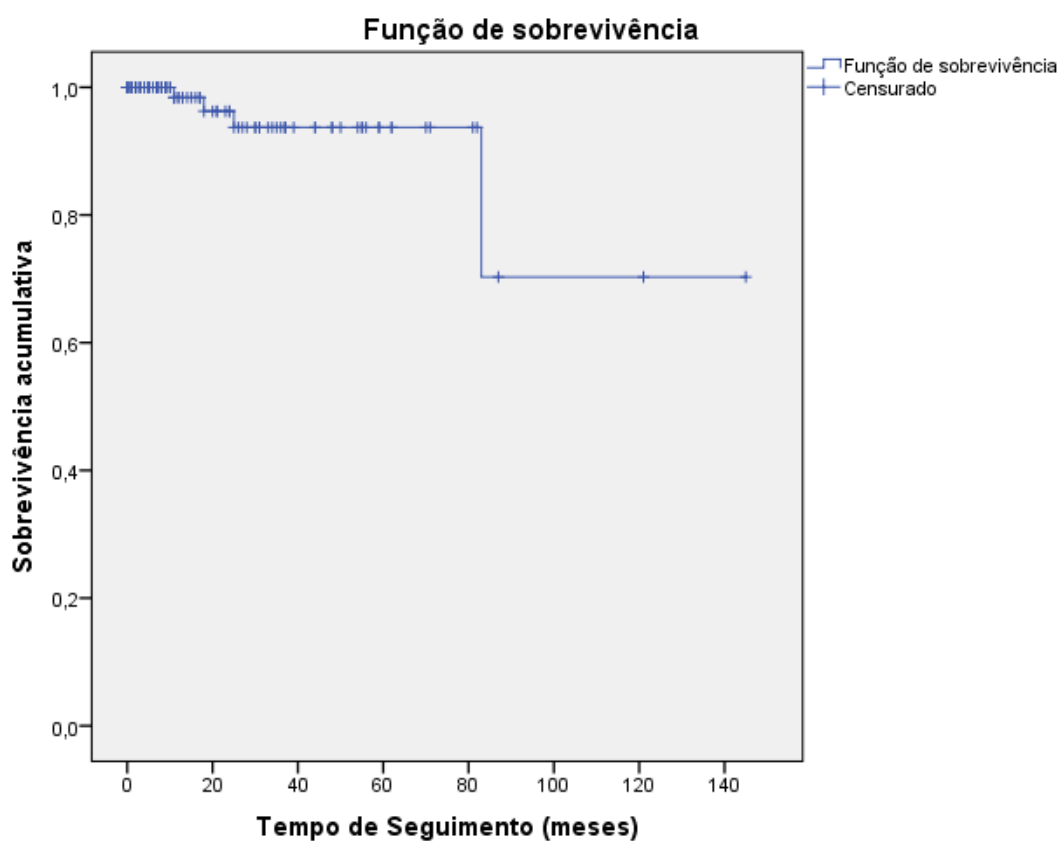


Figura 7 - Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) em pacientes portadores de carcinoma de pênis no ICC no período de 2002 a 2016

A sobrevida global dos pacientes foi de 70,4% após um seguimento médio de $122,7 \pm 13,2$ (96,9 - 148,5) meses. Após dois anos do diagnóstico a proporção cumulativa sobrevivendo ao tempo era de 96,2%, e 93,7% após 5 anos, como pode ser observado na Figura 8.

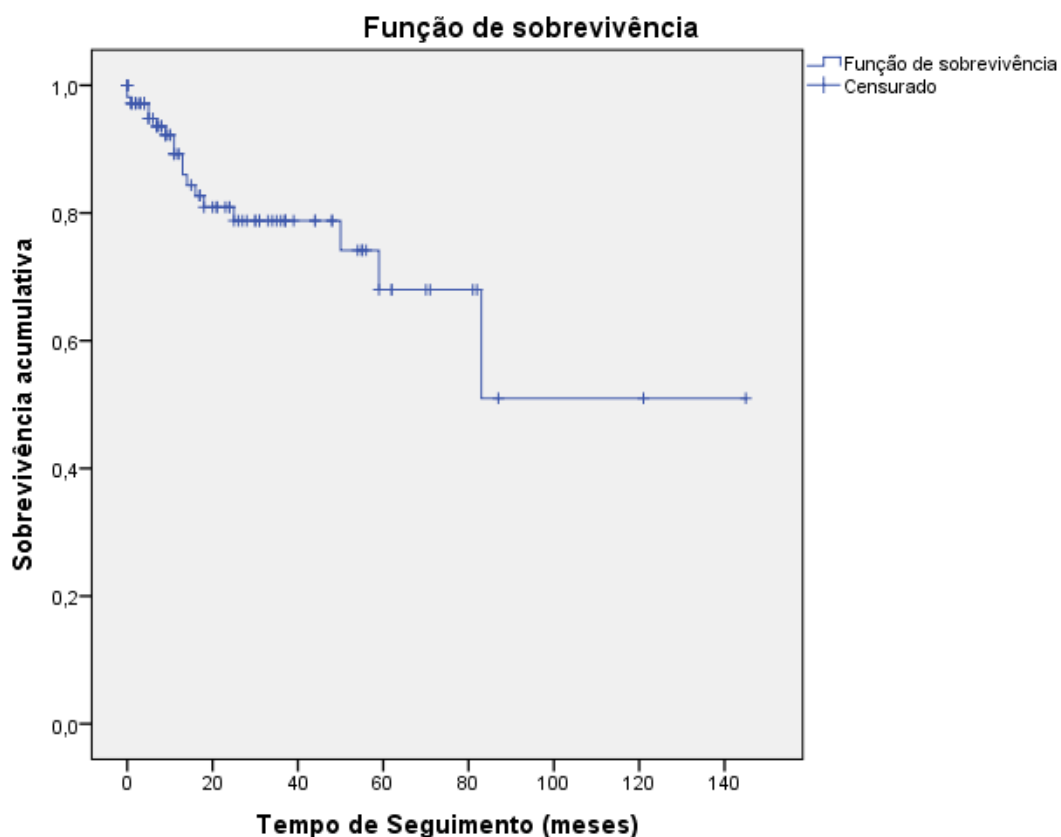
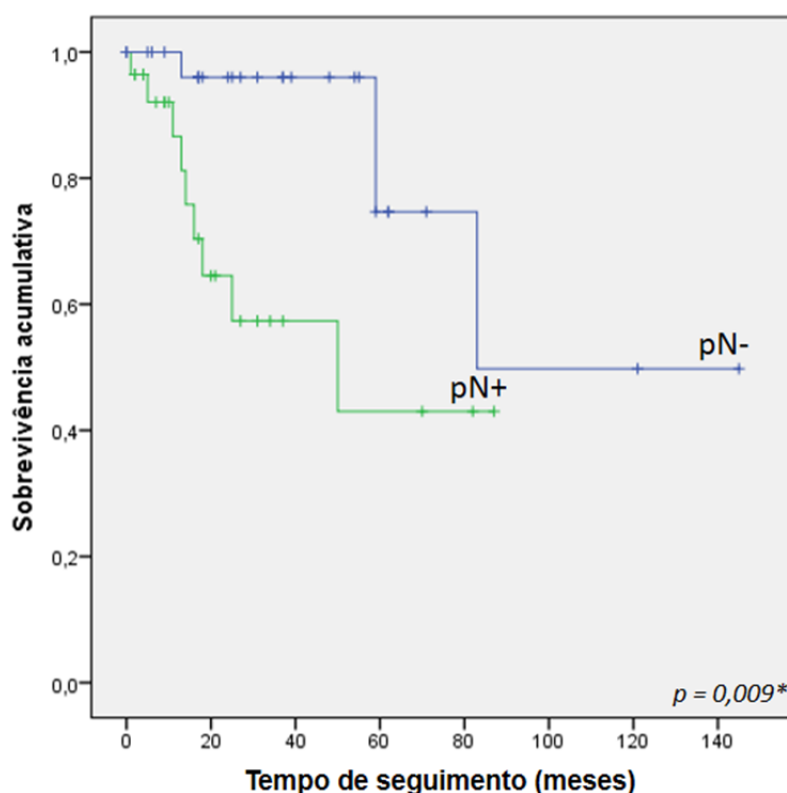


Figura 8 - Curva de sobrevida livre de doença (Kaplan Meier) em pacientes portadores de carcinoma de pênis no ICC no período de 2002 a 2016.

A sobrevida livre de doença dos pacientes foi de 51,0% após um seguimento médio de $96,4 \pm 11,9$ (73,2 - 119,7) meses. Após dois anos do diagnóstico a proporção cumulativa sobrevivendo ao tempo era de 89,2% e de 68,0% após 5 anos (Figura 8)

As curvas de sobrevida livre de doença de acordo com o envolvimento linfonodal se mostraram com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,009$) segundo o teste Log-rank de Mantel-Cox. Pacientes com linfonodo positivo acumulavam uma sobrevida livre de doença média de $50,6 \pm 8,8$ (33,4 - 67,8) meses, e 86,6% deles estavam vivos após dois anos, 43,0% deles após dois anos de seguimento e nenhum com dez anos. Já os

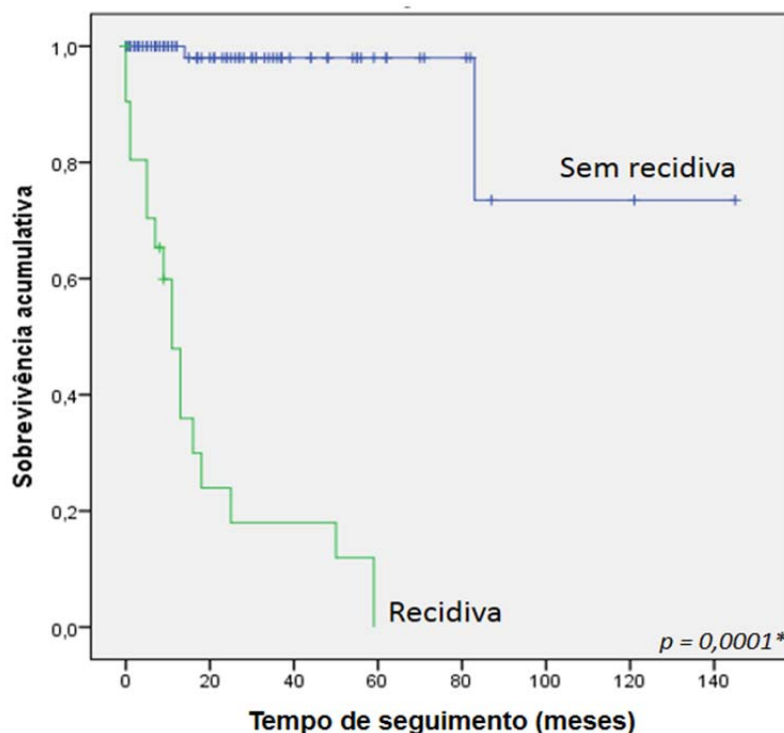
com linfonodo negativo $105,9 \pm 15,8$ (75,0 - 136,8) meses foi a média da sobrevivência, quando 96,0% estavam vivos após dois anos e 49,8% após 10 anos (Figura 9).



Curva de Sobrevivência de Kaplan Meier: sobrevivência de pN- de 49,8% em um seguimento médio de $105,9 \pm 15,8$ (75,0 - 136,8) meses. sobrevivência de pN+ de 43,0% em um seguimento médio de $50,6 \pm 8,8$ (33,4 - 67,8) meses.

*Teste Log-rank de Mantel-Cox

Figura 9 - Curva de sobrevivência câncer específica (Kaplan Meier) de acordo com o status linfonodal (pN) em pacientes portadores de carcinoma de pâncreas no ICC no período de 2002 a 2016.



Curva de Sobrevida de Kaplan Meier: sobrevida de sem recidiva de 73,5% em um seguimento médio de $127,2 \pm 13,3$ ($101,0 - 153,4$) meses. Sobrevida de com recidiva de 24,0% em um seguimento médio de $17,9 \pm 4,6$ ($8,8 - 27,0$) meses.

*Teste Log-rank de Mantel-Cox

Figura 10 - Curva de sobrevida câncer específica em função do IPE de alto e não alto risco em pacientes portadores de carcinoma de pênis no ICC no período de 2002 a 2016.

As curvas de sobrevida câncer específica livre de doença de acordo com o IPE não mostraram significância estatística quando seus três subgrupos eram avaliados isoladamente. No entanto, houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,004$), segundo o teste Log-rank de Mantel-Cox, quando se agrupavam baixo risco com risco intermediário comparados ao alto risco. Pacientes com IPE de alto risco acumulavam uma sobrevida livre de doença média de $80,5 \pm 14,0$ ($53,01-108,09$) meses e os de não alto risco (baixo e médio) acumulavam $100,0 \pm 10,5$ ($79,38 - 120,63$) meses (Figura 10).

5 DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa foram incluídos em artigo publicado em conforme Anexo 3.

Observou-se perda de seguimento em cerca de 58% dos pacientes. Alguns fatos podem justificar esses achados como a dificuldade de locomoção dos pacientes por domicílios distantes ou em outras cidades. Informações de conduta relacionadas ao manejo clínico dos pacientes como radioterapia ou quimioterapia não foram consideradas no presente estudo.

Na casuística encontrada, a média da idade dos pacientes (64 anos) foi dentro do esperado para países em desenvolvimento e para a população de nordeste do Brasil (COUTO et al. 2014; PAIVA et al. 2015). Chama a atenção a ocorrência em pacientes com mais de 80 anos (cerca de 19%) bem como os limítrofes de idade (18 anos e 103 anos), o que provavelmente sejam casos de ocorrência única no Brasil.

Embora tenha observado equilíbrio entre a procedência dos pacientes quando comparados capital e interior, é sabido que muitos pacientes do interior informam para fins de registro de domicílio, endereço válido na capital, o que pode representar um viés do estudo.

Mais de 80% dos pacientes relataram vínculo afetivo à época do diagnóstico. TORBRAND et al. (2017) relatou um aumento de risco de câncer de pênis em pacientes solteiros ou divorciados em uma população de

primeiro mundo, e que aspectos socioeconômicos podem influenciar o risco e o estadiamento da neoplasia.

Embora o carcinoma de pênis tenha uma distribuição racial bem descrita ao redor do mundo, a etnia parda representou quase 80% dos casos, sendo o restante referido como branco e não houve representação das demais etnias.

A presença ou histórico de fimose ao diagnóstico não pôde ser avaliado adequadamente, pois metade dos pacientes foram alocados no estudo como indeterminados.

A abordagem cirúrgica de tipo amputação peniana parcial foi a que preponderou, e em cerca de metade dos pacientes procedeu-se a abordagem linfonodal. Desses, cerca de metade apresentaram metástases linfonodais. Assim como descrito na literatura, tumores em estágio pT2 em padrão vertical de crescimento de subtipo usual e grau histológico moderadamente diferenciado preponderou na amostra. Diferença entre o grau histológico foi observada com achados de COUTO et al. (2014) em pacientes de Pernambuco.

Dificuldades relacionadas ao preenchimento de variáveis patológicas foram observadas, principalmente em laudos anatomopatológicos antigos, com informações macroscópicas incompletas como distância das margens, presença de prepúcio ou mesmo tamanho da lesão. Em geral, laudos recentes e que seguiam recomendações e protocolos macroscópicos foram mais exitosos no preenchimento adequado de informações.

As seguintes características tiveram correlação positiva significativa com a recidiva: invasão vascular, invasão perineural, comprometimento de margens e IPE de alto risco (T18). Carcinomas bem diferenciados tiveram correlação positiva com a presença de coilócitos, invasão de lâmina própria e pT1, enquanto que invasão vascular, perineural, envolvimento linfonodal, corpo esponjoso e cavernoso, tamanho do tumor maior ou igual a 4,0 cm se correlacionaram negativamente.

Apenas as bordas de invasão por grandes blocos e IPE de baixo risco se correlacionaram positivamente com tumores em estágio pT1; o esvaziamento linfonodal, presença de invasão perineural e vascular, tamanho maior que 4,0 cm e tumor localizado na base do pênis mostraram correlação negativa.

A hiperexpressão protéica de c-erbB2 não tem sido relatada na literatura, sendo observada em apenas 01 paciente.

Testes moleculares foram realizados dentro de parâmetros técnicos, no que tange à quantidade e qualidade de DNA. Foram realizados ensaios prévios em projeto piloto com amostras em parafina de material arquivado a mais de 20 anos em que se observou dificuldade na obtenção de DNA válido, motivo pelo qual se passou a incluí-los de forma retroativa no banco de dados. Provavelmente isso se deva ao fato de que as amostras biológicas anteriores a 2009 não utilizavam formol tamponado em sua etapa de fixação.

Nenhum dos pacientes estudados apresentaram mutações ativadoras nos quatro exons codificadores dos domínios tirosinaquinase de EGFR

(exons 18 19 20 e 21), nem a mutação V600E no exon 15 do BRAF. Um paciente apresentou mutação nos exons12/13 de KRAS.

A ausência de mutações significativas para os três genes pesquisados tem sido demonstrada em vários estudos (ANDERSSON et al. 2008; STANKIEWICZ et al. 2011). Embora ocorra a hiperexpressão protéica de EGFR nos carcinomas de pênis, ainda não se demonstrou relação dessa expressão com mutações nos exons que codificam o domínio tirosinaquinase ou com o aumento de número de cópias do gene, em metodologias similares ou por seqüenciamento direto (SILVA AMANCIO et al. 2017). Embora mutações no gene BRAF são encontradas em várias neoplasias e frequentemente referidas em tumores como o melanoma e carcinoma papilar da tireóide, não houve, nos pacientes estudados, detecção da mutação V600E.

Foi detectada no presente estudo, mutação de KRAS em apenas um paciente, a semelhança de GOU et al. (2013), utilizando a técnica de sequenciamento direto e análise conformacional, embora haja na literatura, estudo mostrando mutações somáticas em KRAS e BRAF em câncer de pênis (PULIDO 2015).

O fato de não termos evidenciado um número significativo de mutações impossibilitou o cruzamento de informações como previamente proposto nos objetivos desse estudo, embora o resultado da ausência de mutação represente informação científica relevante para estratégias terapêuticas. A ausência de mutação nos genes KRAS e BRAF, que funcionariam como preditores negativos de respostas, pois sabidamente

impedem a resposta à terapia anti-EGFR, e o achado de hiperexpressão protéica de EGFR amplamente demonstrada na literatura, mesmo na ausência de mutação detectada, podem acenar com um futuro promissor para o desenvolvimento de ensaios clínicos e propostas terapêuticas exitosas (CALMON et al. 2011; DI LORENZO et al. 2013; MCDANIEL et al. 2015).

6 CONCLUSÃO

- 1 O subtipo usual de CEC predominou na população estudada, e subtipos não usuais também estiveram presentes, em acordo com a literatura;
- 2 A invasão vascular, invasão perineural, comprometimento de margem IPE de alto risco tiveram correlação positiva significativa com recidiva;
- 3 A hiperexpressão protéica de c-erbB-2 é um evento raramente observado em pacientes com CaPe;
- 4 Mutações nos genes EGFR, BRAF e KRAS não são significantes em pacientes com CaPe.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aita G, da Costa WH, de Cassio Zequi S, et al. Pattern of invasion is the most important prognostic factor in patients with penile cancer submitted to lymph node dissection and pathological absence of lymph node metastasis. **BJU Int** 2015; 116:584-9.

Andersson P, Kolaric A, Windahl T, Kirrander P, Söderkvist P, Karlsson MG. *PIK3CA*, *HRAS* and *KRAS* gene mutations in human penile cancer. **J Urol** 2008; 179:2030-4.

Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes Control** 2009; 20:449-57.

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.

Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-Sang J, Giuliano AR. Incidence trends in primary malignant penile cancer. **Urol Oncol** 2007; 25:361-7.

Bidinotto LT, Véo CA, Loaiza EA. Low mutation percentage of KRAS and BRAF genes in Brazilian anal tumors. **Mol Med Rep** 2016; 14:3791-7.

Bleeker MCG, Heideman DAM, Snijders PJF, Horembas S, Dillner J, Meijer CJLM. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol** 2009; 27:141-50.

Calmon MF, Tasso Mota M, Vassallo J, Rahal P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. **ScientificWorldJournal** 2011; 11:269-82.

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, Cubilla AL. The role of human papillomavirus infection in the pathogenesis of penile squamous cell carcinomas. **Semin Diagn Pathol** 2012; 29:67-71.

Couto TC, Arruda RM, Couto MC, Barros FD. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **Int Braz J Urol** 2014; 40:738-44.

Crawshaw JW, Hadway P, Hoffland D, et al. Sentinel lymph node biopsy using dynamic lymphoscintigraphy combined with ultrasound-guided fine needle aspiration in penile carcinoma. **Br J Radiol** 2009; 82:41-8.

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

Cubilla AL, Velazquez EF, Reuter VE, Oliva E, Mihm MC, Young RH. Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis. A report of 11 cases and proposed classification of “verruciform” penile tumors. **Am J Surg Pathol** 2000; 24:505-12.

Cubilla AL, Dillner J, Schellhamer PF, et al. Tumors of the penis. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Pathology & genetics tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.279-90. (IARC WHO Classification of Tumours, nº 6).

Cubilla AL, Lloveras B, Alemany L, et al. Basaloid squamous cell carcinoma of the penis with papillary features: a clinicopathologic study of 12 cases. **Am J Surg Pathol** 2012; 36:869-75.

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

da Cunha IW, Souza MJ, da Costa WH, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncological outcomes. **Urol Oncol** 2016; 34:433.e19-26.

Di Lorenzo G, Buonerba C, Ferro M. The epidermal growth factor receptors as biological targets in penile cancer. **Expert Opin Biol Ther** 2015; 15:473-6.

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

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Penis; p.447-55.

Fang JY, Richardson BC. The MAPK signaling pathways and colorectal cancer. **Lancet Oncol** 2005; 6:322-7.

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.

Ferrándiz-Pulido C, Hernández-Losa J, Masferrer E, et al. Identification of somatic gene mutations in penile squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer**. 2015;54:629-37.

Goodman MT, Hernandez BY, Shvestov YB. Demographic and pathologic differences in the incidence of invasive penile cancer in the United States 1995-2003. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007; 16:1833-9.

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 RSM, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastasis. **Urology** 2006; 68:148-53.

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.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Heyns CF, Theron PD. Evaluation of dynamic sentinel lymph node biopsy in patients with squamous cell carcinoma of the penis and palpable inguinal nodes. **BJI Int** 2008; 102:305-9.

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

Jensen JB, Jensen KME, Ulhoi BP, Nielsen SS, Lundbeck F. Sentinel lymph-node biopsy in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **BJU Int** 2009; 103:1199-203.

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC- RAS - BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Res** 2003; 63:1454-7.

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

Leite CAVG, Costa JVG, Callado RB, Torres JNL, Lima Júnior RCP, Ribeiro RA. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in câncer. **Rev Bras Oncol Clín** 2012; 8:130-42.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell** 2010; 141:1117-34.

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

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

McDaniel AS, Hovelson DH, Cani AK, et. al. Genomic profiling of penile squamous cell carcinoma reveals new opportunities for targeted therapy. **Cancer Res** 2015; 75:5319-27.

Mentrikoski MJ, Stelow EB, Culp S, Frierson HF Jr, Cathro HP. Histologic and immunohistochemical assessment of penile carcinomas in a North American population. **Am J Surg Pathol** 2014; 38:1340-8.

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

Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs- Part A: renal, penile, and testicular tumours. **Eur Urol** 2016; 70:93-105.

Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevez C, Palacios J, Hardisson D, Shiozawa T. Low frequency of BRAF mutations in endometrial and in cervical carcinomas. **Clin Cancer Res** 2005; 12:6133-8.

Mosconi AM, Roila F, Gatta G, Theodore C. Cancer of the penis. **Crit Rev Oncol/Hematol** 2005; 53:165-77.

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

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

Ornellas AA, Seixas ALC, Marota A, Wisnecky A, Campos F, Moraes JR. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. **J Urol** 1994; 151:1244-9.

Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BLB, Wisnecky A, Koifman, N, Quirino R. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. **J Urol** 2008; 97:487-95.

Paiva GR, de Oliveira Araújo IB, Athanazio DA, de Freitas LA. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. **Int Urol Nephrol** 2015; 47:295-9.

Protzel C, Spiess PE. Molecular research in penile cancer-lessons learned from the past and bright horizons of the future? **Int J Mol Sci** 2013;14:19494-505.

QIAGEN. **KRAS Pyro Kit**. 2013a. Available from: <URL:<https://bit.ly/2X0iKpp>> [2017 fev 13].

QIAGEN. **EGFR Pyro Kit**. 2013b. Available from: <URL:<https://bit.ly/2ZBs7Zt>>. [2017 fev 13].

Roskoski R, Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 319:1-11.

Sanchez DF, Soares F, Alvarado-Cabrero, et al. Pathological factors, behavior, and histological prognostic risk groups in subtypes of penile squamous cell carcinomas (SCC). **Semin Diagn Pathol** 2015; 32:222-31.

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.

Silva Amancio AM, Cunha IW, Neves JI, et al. Epidermal growth factor receptor as an adverse survival predictor in squamous cell carcinoma of the penis. **Hum Pathol** 2017; 61:97-104.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. [tradução de A L M Eisenberg]. 7ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012. Pênis; p.249-52.

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.

Stenzel A, Semczuk A, Rozynskalk K, Jakowicki J, Wojcierowski J. “Low-risk” and “high-risk” HPV-infection and K-ras gene point mutation in human cervical cancer: a study of 31 cases. **Pathol Res Pract** 2001; 197:597-603.

Torbrand C, Wigertz A, Drevin L, et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality; a population-based study. **BJU Int** 2017; 119:254-60.

Velazquez EF, Melamed J, Barreto JE, Agüero F, Cubilla AL. Sarcomatoid carcinoma of the penis: a clinicopathologic study of 15 cases. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1152-8.

Velazquez EF, Cubilla AL. Penile squamous cell carcinoma: anatomic, pathologic, and viral studies in Paraguay (1993-2007). **Anal Quant Cytol Histol** 2007; 29:185-98.

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

Weber A, Langhanki L, Sommerer F, Markwarth A, Wittekind C, Tannapfel A. Mutation of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oncogene** 2003; 22:4757-9.

Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2014; 138:241-56.

Zequi Sde C, 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.

Apêndice 1 - Epidermal growth factor receptor as an adverse survival predictor in squamous cell carcinoma of the penis

Human Pathology (2017) 61, 97–104



Human
PATHOLOGY

www.elsevier.com/locate/humpath

Original contribution

Epidermal growth factor receptor as an adverse survival predictor in squamous cell carcinoma of the penis ☆,☆☆



Alice Muglia Thomaz da Silva Amancio PhD^a, Isabela Werneck da Cunha MD, PhD^a,
José Ivanildo Neves MSc^a, Josiane da Silva Quetz PhD^b, Dirce Maria Carraro PhD^a,
Rafael Malagoli Rocha PhD^a, Stenio Cássio Zequi MD, PhD^c,
Antonio Leopoldo Cubilla MD^d, Francisco Paulo da Fonseca MD, PhD^c,
Ademar Lopes MD, PhD^c, Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha MD^b,
Marcos Venício Alves Lima MD, PhD^e, José Vassallo MD, PhD^{a,f},
Gustavo Cardoso Guimarães MD, PhD^c, Fernando Augusto Soares MD, PhD^{a,g,*}

^aDepartment of Anatomic Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, 01508-010, São Paulo, SP, Brazil

^bDepartment of Pathology, Cancer Institute of Ceara, 60351-010, Fortaleza, CE, Brazil

^cUrology Division, Department of Pelvic Surgical Oncology, A.C. Camargo Cancer Center, 01508-010, São Paulo, SP, Brazil

^dInstituto de Patología e Investigación, Universidad Nacional de Asunción, 1617, Asunción, Paraguay

^eDepartment of Urology, Cancer Institute of Ceara, 60351-010, Fortaleza, CE, Brazil

^fLaboratory of Molecular and Investigative Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas Medical School, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^gGeneral Pathology, Faculty of Dentistry, University of São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

Apêndice 2 - Lista de variáveis

Tabela 1 - Variáveis a serem avaliadas nas análises estatísticas

	Casos	Indeterminado /ausente	Total
	N (%)	N (%)	N
Tempo de seguimento (meses)	108 (100,0)	- (0)	108
Recidiva	108 (100,0)	- (0)	108
Idade	108 (100,0)	- (0)	108
Procedência	108 (100,0)	- (0)	108
Estado civil	104 (96,3)	4 (3,7)	108
Etnia	98 (90,7)	10 (9,3)	108
Fimose	52 (48,1)	56 (51,9)	108
Tipo de cirurgia	108 (100,0)	- (0)	108
Tipo de esvaziamento linfonodal realizado	108 (100,0)	- (0)	108
Número de linfonodos comprometidos	108 (100,0)	- (0)	108
Número de linfonodos ressecados	108 (100,0)	- (0)	108
pT (TNM 7a ed.)	107 (99,1)	1 (0,9)	108
pN (TNM 7a ed.)	108 (100,0)	- (0)	108
pM (TNM 7a ed.)	108 (100,0)	- (0)	108
Localização do tumor	108 (100,0)	- (0)	108
Tamanho do tumor (cm)	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Padrão de crescimento	83 (76,8)	25 (23,2)	108
Presença de lesão macroscópica associada	108 (100,0)	- (0)	108
Tipo de lesão associada	7 (6,5)	101 (93,5)	108
Tipo histológico	108 (100,0)	- (0)	108
Grau histológico	108 (100,0)	- (0)	108
Invasão de lâmina própria	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Invasão de corpo esponjoso	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Invasão de corpo cavernoso	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Invasão de uretra	108 (100,0)	- (0)	108
Invasão de glândula	107 (99,1)	1 (0,9)	108

Cont/ Tabela 1

	Casos N (%)	Indeterminado /ausente N (%)	Total N
Invasão de prepúcio	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Invasão de sulco balanoprepucial	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Invasão de órgão adjacente	108 (100)	- (0)	108
Infiltração (cm)	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Presença de invasão vascular	108 (100)	- (0)	108
Tipo de invasão vascular	29 (26,8)	79 (73,2)	108
Extensão da invasão vascular	10 (9,3)	98 (90,7)	108
Presença de invasão neural	108 (100)	- (0)	108
Bordas de invasão	86 (79,6)	22 (20,4)	108
Índice prognóstico de escores	107 (99,1)	1 (0,9)	108
Infecção por HPV	90 (83,3)	18 (16,7)	108
Presença de lesão microscópica associada	108 (100)	- (0)	108
Presença de hiperplasia epitelial	5 (4,6)	103 (95,4)	108
Presença de lesão intraepitelial	4 (3,7)	104 (96,3)	108
Tamanho das metástase	24 (22,2)	84 (77,8)	108
Presença de extravasamento capsular	24 (22,2)	84 (77,8)	108
Presença de coalescência linfonodal	24 (22,2)	84 (77,8)	108
Local de origem dos linfonodos	24 (22,2)	84 (77,8)	108
Lateralidade da linfadenectomia	24 (22,2)	84 (77,8)	108
Comprometimento de margem	108 (100)	- (0)	108
Menor distância da ressecção (cm)	102 (94,4)	6 (5,6)	108
Follow-up status	98 (90,7)	10 (9,3)	108
Mutação em KRAS	108 (100)	- (0)	108
Mutação em BRAF	98 (90,7)	10 (9,3)	108
Mutação em EGFR	100 (92,6)	8 (7,4)	108
Imunodeteccãode cerbB2	108 (100)	- (0)	108

Anexo 1 - Protocolo de estudo carcinoma de pênis do Hospital A.C. Camargo

PROTOCOLO DE ESTUDO CARCINOMA DE PÊNIS

Favor destacar este protocolo do
livreto, preencher e encaminhar
para o Centro de Pesquisa.

Anexo 2 - Livreto de orientação para preenchimento do protocolo de estudo
carcinoma de pênis

**LIVRETO DE ORIENTAÇÃO PARA
PREENCHIMENTO DO
PROTOCOLO DE ESTUDO
CARCINOMA DE PÊNIS**

Grupo Colaborativo de Estudos em
Carcinoma de Pênis

Guimarães, G.; Lopes A.;
Cubilla, A.; Soares, F.

Anexo 3 – Classificação TMN

Primary Tumor (T)	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Noninvasive verrucous carcinoma*
T1a	Tumor invades subepithelial connective tissue without lymph vascular invasion and is not poorly differentiated (i.e., grade 3–4)
T1b	Tumor invades subepithelial connective tissue with lymph vascular invasion or is poorly differentiated
T2	Tumor invades corpus spongiosum or cavernosum
T3	Tumor invades urethra
T4	Tumor invades other adjacent structures
Regional Lymph Nodes (N)	
<i>Clinical Stage Definition*</i>	
cNX	Regional lymph nodes cannot be assessed
cN0	No palpable or visibly enlarged inguinal lymph nodes
cN1	Palpable mobile unilateral inguinal lymph node
cN2	Palpable mobile multiple or bilateral inguinal lymph nodes
cN3	Palpable fixed inguinal nodal mass or pelvic lymphadenopathy unilateral or bilateral
* Note: Clinical stage definition based on palpation, imaging.	
<i>Pathologic Stage Definition*</i>	
pNX	Regional lymph nodes cannot be assessed
pN0	No regional lymph node metastasis
pN1	Metastasis in a single inguinal lymph node
pN2	Metastasis in multiple or bilateral inguinal lymph nodes
pN3	Extranodal extension of lymph node metastasis or pelvic lymph node(s) unilateral or bilateral
* Note: Pathologic stage definition based on biopsy or surgical excision.	
Distant Metastasis (M)	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis*

Fonte: EDGE et al. (2010).

Anexo 4 - Classificação de carcinoma de pênis WHO 2016

WHO classification of tumours of the penis

Malignant epithelial tumours		Leiomyoma	8890/0
Squamous cell carcinoma	8070/3	Lymphangioma	9170/0
Non-HPV-related squamous cell carcinoma		Myointimoma	9137/0*
Squamous cell carcinoma, usual type	8070/3	Neurofibroma	9540/0
Pseudohyperplastic carcinoma		Schwannoma	9560/0
Pseudoglandular carcinoma	8075/3		
Verrucous carcinoma	8051/3	<i>Malignant tumours (including tumours of uncertain malignant potential, marked with *)</i>	
Carcinoma cuniculatum		Angiosarcoma	9120/3
Papillary squamous cell carcinoma, NOS	8052/3	Clear cell sarcoma	9044/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Dermatofibrosarcoma protuberans*	8832/3
Sarcomatoid squamous cell carcinoma	8074/3	Epithelioid haemangioendothelioma	9133/3
Mixed squamous cell carcinoma	8070/3	Epithelioid sarcoma	8804/3
HPV-related squamous cell carcinoma		Ewing sarcoma	9364/3
Basaloid squamous cell carcinoma	8083/3	Giant cell fibroblastoma*	8834/1
Papillary-basaloid carcinoma		Kaposi sarcoma	9140/3
Warty carcinoma	8054/3*	Leiomyosarcoma	8890/3
Warty-basaloid carcinoma		Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3
Clear cell squamous cell carcinoma	8084/3	Myxofibrosarcoma	8811/3
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3	Undifferentiated pleomorphic sarcoma	8802/3
Other rare carcinomas		Osteosarcoma, extraskeletal	9180/3
		Rhabdomyosarcoma	8900/3
		Synovial sarcoma	9040/3
Precursor lesions		Lymphomas	
Penile intraepithelial neoplasia	8077/2	Metastatic tumours	
Warty/basaloid/warty-basaloid			
Differentiated penile intraepithelial neoplasia	8071/2*		
Paget disease	8542/3		
Melanocytic lesions			
Mesenchymal tumours			
<i>Benign tumours</i>		The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions.	
Benign fibrous histiocytoma	8830/0	*New code approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O.	
Glomus tumour	8711/0		
Granular cell tumour	9580/0		
Haemangioma	9120/0		
Juvenile xanthogranuloma			

Anexo 5 - Aprovação do CEP

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO, MOLECULAR E VIRAL DO CÂNCER DE PÊNIS EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO NORDESTE BRASILEIRO.

Pesquisador: Marcos Venício Alves Lima

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 3

CAAE: 18242113.0.0000.5528

Instituição Proponente: Instituto do Cancer do Ceara

Patrocinador Principal: Instituto do Cancer do Ceara

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 811.603

Data da Relatoria: 29/10/2014

Apresentação do Projeto:

O carcinoma de pênis (CaPe) representa hoje, um dos grandes problemas e desafios para a saúde pública no Brasil, correspondendo a aproximadamente 2,1% de todos os tumores do homem brasileiro, com incidência maior nas regiões norte e nordeste. Os principais fatores de risco são más condições de higiene, baixo padrão sócio-econômico e fimose, bem como exposição ao tabaco, número de parceiros sexuais e infecção pelo papilomavírus humano (HPV). A presença de acometimento linfonodal é o fator que mais se relaciona à diminuição da sobrevida. Embora de fácil diagnóstico, a maioria dos pacientes procuram o serviço médico em estágios avançados, o que reduz suas chances de cura. Com o advento dos alvos terapêuticos, faz-se necessário um conhecimento maior do CaPe, principalmente no que tange aos aspectos moleculares, ainda pouco conhecidos. O conhecimento sobre a mutação em genes relacionados à via de sinalização celular EGFR/RAS/RAF pode representar um acréscimo na abordagem terapêutica desses pacientes. Foi acrescentado estudo imunoistoquímico para cERBB2 e estendida a data para a seleção retrospectiva dos casos (2002 a 2014) para que as análises moleculares sejam possíveis, visto que blocos muito antigos tem apresentado pior performance, gerando muitos resultados inválidos

Endereço: PAPI JUNIOR

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.441-700

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

Continuação do Parecer: 811.603

Objetivo da Pesquisa:

Determinar o perfil clínico-patológico, imunoistoquímico, molecular e viral do câncer de pênis no Estado do Ceará em pacientes atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba via SUS, com vistas à futuras correlações com prognóstico. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1. Validar a nova classificação da OMS, bem como o índice prognóstico de escores com melhor caracterização clinicopatológica das entidades menos frequentes de carcinomas de pênis. 2. Conhecer os subtipos de carcinomas de pênis presentes em nosso estado e estabelecer uma relação com metástases linfonodais, sobrevida livre de doença e sobrevida global, com a validação de índices prognósticos. 3. Contribuir para melhor compreensão da etiopatogenia molecular, mecanismos de estabelecimento e progressão tumoral e vias de controle do carcinoma de pênis pelo rastreamento de éxons mutados nos genes EGFR, KRAS e BRAF. 4. Determinar as taxas de prevalência e os subtipos de HPV presentes nos carcinomas de pênis de pacientes do SUS tratados no HHJ/ICC, de modo a elucidar as interações virais que podem contribuir para o desenvolvimento de CaPe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: como vai utilizar tecido já obtido dos pacientes em seu tratamento padrão e como haverá o cuidado de deixar material nos blocos para o caso de haver necessidade de revisões e complementações de exames posteriormente e como está assegurada a confidencialidade dos dados não há maiores riscos. A descoberta de terapêuticas mais efetivas trará benefícios para os portadores da neoplasia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com possibilidade de contribuir para a melhor qualidade do tratamento dos pacientes com câncer de pênis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão de acordo com as normas

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As modificações feitas no projeto estão de acordo com os princípios éticos da Pesquisa em seres humanos.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: PAPI JÚNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 811.603

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

o Colegiado do CEP acompanha o parecer do relator e aprova o projeto.

FORTALEZA, 29 de Setembro de 2014

Assinado por:
Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

Anexo 6 - Vínculo de instituição participante

VÍNCULO DE INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE

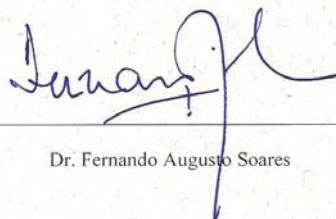
São Paulo, 14 de julho de 2014.

Declaro para os devidos fins, que eu, Dr. Fernando Augusto Soares, participei como pesquisador colaborador do projeto de pesquisa: **"PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO, MOLECULAR E VIRAL DO CANCER DE PÊNIS EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM ONCOLOGIA NO NORDESTE BRASILEIRO"**, que está sob coordenação do Dr. Marcos Venício Alves Lima – pesquisador do Instituto do Câncer do Ceará (ICC).

O objetivo de tal projeto é investigar o câncer de pênis na população do Nordeste brasileiro de forma a abranger dados morfológicos, classificação de subtipos, grau histológico, grau de invasão vascular, grau de invasão perineural e o padrão de invasão do tumor, além do rastreamento de éxons mutados em genes cruciais para a via de sinalização celular EGFR-RAS-RAF, e ainda a participação das infecções por subtipos de HPV em um número considerável de amostras ICC. Os passos de detecção de HPV e genotipagem serão realizados no A.C. Camargo Cancer Center.

A aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)-ICC ocorreu em 26 de Setembro de 2013, conforme parecer 407.315, e, portanto, aguardamos aprovação do CEP do A.C. Camargo Cancer Center para início dos trabalhos.

Conforme requisitos da Resolução 196/96 e suas complementares, os dados e materiais coletados serão utilizados exclusivamente para os fins da pesquisa.



Dr. Fernando Augusto Soares