

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA DA NUCLEOFOSMINA,
P53 E KI67 COMO FATORES PROGNÓSTICOS
EM CÂNCER DE PENIS**

RODRIGO SOUSA MADEIRA CAMPOS

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Oncologia**

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Campos, Rodrigo Sousa Madeira

Análise da nucleofosmina, Ki67 e p53 como fatores prognósticos em câncer de pênis / Rodrigo Sousa Madeira Campos - São Paulo, 2018.

108p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 2. Prognóstico/Prognosis. 3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Análise Estatística/Statistical Analysis. 5. Genes p53/Genes, p53. 6. Sobrevida/Survival. 7. Metástase Linfática/Lymphatic Metastasis. 8. Nucleofosmina/Nucleophosmin. 9. Antígeno Ki-67/Ki-67 Antigen

DEDICATÓRIA

À Simone, minha incansável companheira, cujo amor, paciência e dedicação são fundamentais em absolutamente tudo que faço. Sem o seu apoio, esse e vários outros projetos não se tornariam realidade.

Aos meus queridos filhos Victor, Beatriz e Nina, capazes de alegrar os meus dias mais tumultuados e que se tornaram a uma enorme motivação na minha existência. Souberam suportar pacientemente todas as minhas ausências.

Aos meus queridos pais, José Felipe e Elizabeth, que desde cedo me mostraram o caminho reto do trabalho e honestidade, pelo amor e cuidado a mim dedicados desde os meus primeiros dias.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, diretor do Departamento de Urologia, pelos seus ensinamentos e apoio incondicional à minha atividade profissional. Inspira a todos com seu espírito incansável e inovador.

Ao Dr. Stênio de Cássio Zequi, colega de departamento, pelos sábios conselhos e incentivo constante à minha vida acadêmica e profissional, desde os meus primeiros passos.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, vice presidente da Fundação Antônio Prudente, meu orientador e grande incentivador da minha atividade profissional. Agradeço imensamente pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, ex diretor do Departamento de Anatomia Patológica, meu co-orientador, por haver viabilizado a realização deste projeto com toda a estrutura do seu laboratório e com a disponibilidade do seu tempo para a leitura de todas as lâminas.

À Thais Safranov Giuliangelis, enfermeira de pesquisa do departamento de cirurgia pélvica, pela valiosa ajuda na construção do banco de dados.

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, pela amizade e pela valiosa ajuda na análise e interpretação estatística desse trabalho. Sempre disponível e solícito.

À Sra. Suely Francisco e a todos os funcionários da Biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center, pela inestimável ajuda no levantamento da bibliografia desse manuscrito.

Aos colegas de departamento Bruno Santos Benigno, Lucas Fornazieri, Thiago Borges Marques Santana, Ricardo de Lima Favaretto, Renato Rosa de Oliveira, Maurício Murce, Carlos Alberto Ricetto Sacomani, Rafael Meduna e Wilson Bachega Júnior pela amizade e pela valiosa ajuda em todos os momentos em que tive que me ausentar.

À Srta. Marina França de Resende, pela presteza na realização das reações imunoistoquímicas.

À Dra. Isabela Werneck, exemplo de pesquisadora, pelas valiosas dicas e incentivo.

À Sra. Ana Maria Kuninari e a todos os funcionários da pos graduação, pela paciência e dedicação com que cuidam de todos nós, alunos e orientadores.

Ao Dr. Fabrício Chaves Novaes e o Dr. Leonardo Welter Neto, amigos e colegas de trabalho, que tanto contribuíram para que eu conseguisse organizar as horas necessárias à realização desse projeto.

RESUMO

Campos RSM. **Análise da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53 como fatores prognósticos em câncer de pênis.** São Paulo 2018. Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente.

O carcinoma epidermóide do pênis tem incidência significativa em países em desenvolvimento como o Brasil. O tratamento dos tumores invasivos consiste na ressecção da lesão primária e linfadenectomia bilateral, procedimento associado a alta taxa de morbidade. O estudo de fatores prognósticos do tumor primário pode ajudar na seleção dos pacientes candidatos às linfadenectomias. A expressão imunoistoquímica do ki-67, do p53 e da nucleofosmina (NPM) se associam a pior prognóstico em diversas neoplasias. Estudamos retrospectivamente 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis, submetidos a cirurgia do tumor primário no Departamento de Cirurgia Pélvica do AC Camargo Cancer Center. Os blocos de parafina foram revisados e submetidos a coloração imunoistoquímica para NPM, ki-67 e p53. A leitura foi realizada no dispositivo Aperio®. A imunorreatividade da NPM, Ki67 e p53 foi relacionada a fatores clínicos e patológicos: idade, estado civil, raça, tempo de evolução da doença, antecedentes venéreos, estadiamento clínico, espessura do tumor, grau de diferenciação, embolização linfovascular, estadiamento patológico, tipo de invasão. Analisamos quais fatores influenciaram o risco de metástases linfonodais e sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD). Os testes estatísticos de associação utilizados foram o Qui-quadrado, teste de Fischer, a regressão logística múltipla. Na análise de sobrevida utilizamos o Kaplan e Meier, o Log-rank e o modelo de riscos proporcionais de cox. A imunorreatividade do p53 estava alta em 42,3% dos casos e se associou a maior ocorrência de recidivas, mas não a outras variáveis. A imunorreatividade do Ki67 estava alta em 89,1% dos casos e não se associou a nenhuma variável. A NPM apresentou imunoexpressão baixa em 50% dos casos e se associou a maiores estadios clínicos T e N e invasão de corpo cavernoso. A imunorreatividade do p53, da NPM e do Ki67 não se associaram a metástases linfonodais. A ocorrência de metástases linfonodais foi influenciada pelo estadiamento clínico N ($p=0,001$), grau de diferenciação ($p=0,007$), invasão vascular ($p=0,004$), invasão perineural ($p<0,001$), infiltração de corpos cavernosos ($p=0,004$), infiltração da uretra ($p=0,013$) e

espessura tumoral ($p=0,008$). No modelo multivariado, estadiamento clínico N ($RR=5,5$; IC [1,4-20,8], infiltração de corpos cavernosos ($RR=3,9$; IC [1,2-12,3] e invasão perineural ($RR=4,9$; IC [1,5-16,2] foram fatores independentes de risco de metástases linfonodais. A SG ao final de 120 meses foi de 47,3% e foi influenciada por raça ($p=0,009$), recidivas ($p=0,018$), grau moderado e alto ($p=0,031$), infiltração de corpos cavernosos ($p=0,037$), invasão vascular ($p=0,02$), invasão perineural ($p=0,030$), espessura tumoral >5 mm ($p=0,015$) e metástases linfonodais ($p=0,003$). A imunexpressão da NPM, do Ki67 e do p53 não influenciou a SG. Na análise multivariada, a invasão vascular ($RR=1,9$; IC [1,0-3,6]) se associou a menor SG. A SLD foi influenciada por infiltração de corpo cavernoso ($p<0,001$), infiltração da uretra ($p=0,032$), infiltração vascular ($p<0,001$), metástases linfonodais ($p<0,001$) e alta imunexpressão do p53 ($p=0,008$). A imunorreatividade do Ki67 e da NPM não influenciaram a SLD. Na análise multivariada apenas a invasão de corpo cavernoso ($RR=4,0$; IC [1,4-11,3]) e a ocorrência de metástases linfonodais ($RR=4,2$; IC [1,4-13,1]) se associaram a menor SLD. Os resultados permitem concluir que a alta expressão do p53 se associou a pior SLD na análise univariada e a perda de expressão da NPM se associou a maiores estadios clínico e patológico.

SUMMARY

Campos RSM. [Evaluation of prognostic value of the immunohistochemistry expression of the nucleophosmine, p53 and Ki67 in patients with penile carcinoma]. São Paulo 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Penile carcinoma still has relevant incidence in developing countries like Brazil. The gold standard for the treatment of invasive lesions remains amputation followed by bilateral lymphadenectomy, procedures associated with high morbidity. The identification of prognostic factors could help to select the best candidates to lymphadenectomies. The immunoreactivity of p53, nucleophosmin (NPM) and ki67 has been associated with the prognosis of many tumors. A retrospective study of 112 patients with penile carcinoma submitted to amputation and lymphadenectomy at the Division of Urology of A.C.Camargo Cancer Center was undertaken to evaluate the prognostic value of immunoreactivity of p53, NPM and Ki67 in the primary tumor. The immunoreactivity of these proteins were correlated with the followed factors: age, race, marital status, time to diagnosis, venereal history, clinical stage, tumor thickness, histological grade, lymphovascular embolization, corpora cavernosa and urethra infiltration, pattern of invasion, lymph node metastasis, overall survival (OS) and disease free survival (DFS). The association among variables was done by the chi-square test and the survival analysis were performed with the Kaplan & Meier technique and the multi-factorial analysis by the Cox regression technique. The p53 immunoreactivity was high in 42,3% of the cases and was associated with high recurrence rates, but not with other variables. Ki67 immunoreactivity was high in 89,1% of the cases and was not associated with any variable. NPM immunostaining was considered low in 50% of the cases and was associated with higher clinical stages N and T and corpora cavernosa invasion, but not with other variables. There was no association between NPM, p53 and Ki67 immunostaining and lymph node metastasis. Clinical stage N ($p=0,001$), grade of differentiation ($p=0,007$), vascular invasion ($p=0,004$), perineural invasion ($p<0,001$), corpora cavernosa infiltration ($p=0,004$), urethral infiltration ($p=0,013$) and tumor thickness ($p=0,008$) were

significant for the incidence of lymph node metastasis. The multivariate analysis revealed that clinical stage N (RR=5,5; CI [1,4-20,8]), corpora cavernosa infiltration (RR=3,9; CI [1,2-12,3]) and perineural invasion (RR=4,9; CI [1,5-16,2]) were significant for the incidence of lymph node metastasis. The OS at the end of 120 months was 47,3% and was influenced by race (p=0,009), recurrences (p=0,018), moderate or high pathologic grade (p=0,031), corpora cavernosa infiltration (p=0,037), lymphovascular embolization (p=0,02), perineural invasion (p=0,030), tumor thickness (p=0,015) and lymph node metastasis (p=0,03). There was no association between p53, NPM and Ki67 immunoreactivity and OS. Multivariate analysis revealed that vascular invasion (RR=1,9; CI [1,0-3,6]) influenced OS. DFS was influenced by corpora cavernosa infiltration (p<0,001), urethra infiltration (p=0,032), lymphovascular embolization (p<0,001), lymph node metastasis (p<0,001) and p53 immunostaining (p=0,008). NPM and Ki67 immunoreactivity did not influence DFS. Multivariate analysis revealed that corpora cavernosa infiltration (RR=4,0; CI [1,4-11,3]) and lymph node metastasis (RR=4,2; CI [1,4-13,1]) influenced DFS. These results showed that higher p53 expression was associated with a worst DFS at univariate analysis and the low NPM imunoexpression was associated with higher clinical and pathological stages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do gene p53	27
Figura 2	Fatores que causam stress celular e proteínas efetoras que levam a ativação de p53.....	31
Figura 3	Respostas ao stress celular moduladas por p53.....	31
Figura 4	Localização dos códons que apresentam maior frequência de mutação do gene p53.....	32
Figura 5	Microfotografia demonstrando alta expressão e baixa expressão nuclear da nucleofosmina em carcinoma epidermóide de pênis	45
Figura 6	Microfotografia demonstrando forte expressão nuclear de Ki67 em carcinoma epidermóide de pênis.....	46
Figura 7	Microfotografia demonstrando expressão nuclear de p53 em carcinoma epidermóide de pênis.....	46
Figura 8	Curva de sobrevida global para 112 pacientes portadores de carcinoma peniano	65
Figura 9	Curva de sobrevida global segundo a expressão imunohistoquímica da nucleofosmina em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis	69

Figura 10	Curva de sobrevida global segundo a expressão imunoistoquímica do Ki67 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis	69
Figura 11	Curva de sobrevida global segundo a expressão imunoistoquímica do p53 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis	70
Figura 12	Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão imunoistoquímica da nucleofosmina em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.....	74
Figura 13	Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão imunoistoquímica do Ki67 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.....	74
Figura 14	Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão imunoistoquímica do p53 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.....	75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Sistema de classificação do tumor de pênis - TNM, AJCC 2009	8
Quadro 2	Estádios separados conforme a Classificação da AJCC	9
Quadro 3	Especificações dos anticorpos e diluições utilizadas nas reações de imunoistoquímica	44
Tabela 1	Frequência das variáveis clínicas e epidemiológicos em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis	51
Tabela 2	Frequência das variáveis anatomopatológicas do tumor primário em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis	54
Tabela 3	Expressão imunoistoquímica da Nucleofosmina, Ki67 e p53 no tumor primário	55
Tabela 4	Associação da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina com variáveis clínicas e epidemiológicas	56
Tabela 5	Associação da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina com variáveis patológicas	57
Tabela 6	Associação da expressão imunoistoquímica do p53 com variáveis clínicas e epidemiológicas	58

Tabela 7	Associação da expressão imunoistoquímica do p53 com variáveis patológicas.....	59
<hr/>		
Tabela 8	Associação da expressão imunoistoquímica do Ki67 com variáveis clínicas e epidemiológicas.....	60
<hr/>		
Tabela 9	Associação da expressão imunoistoquímica do Ki67 com variáveis patológicas.....	60
<hr/>		
Tabela 10	Associação entre variáveis clínicas e demográficas com a presença de metástases linfonodais.....	61
<hr/>		
Tabela 11	Associação entre variáveis patológicas e imunoistoquímicas e a presença de metástases linfonodais.....	62
<hr/>		
Tabela 12	Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para risco de metástases linfonodais.....	63
<hr/>		
Tabela 13	Risco de metástases linfonodais pela análise multivariada.....	64
<hr/>		
Tabela 14	Situação clínica dos 112 pacientes ao final do seguimento.....	64
<hr/>		
Tabela 15	Probabilidade acumulada de sobrevida global aos 10 anos de acordo com variáveis clínicas.....	66
<hr/>		
Tabela 16	Probabilidade acumulada de sobrevida global aos 10 anos de acordo com variáveis patológicas e gradação imunoistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53.....	67

Tabela 17	Lista de variáveis selecionadas para análise multivariada da sobrevida global por ordem de entrada	68
Tabela 18	Risco de óbito em pacientes portadores de carcinoma peniano de acordo com modelo multivariado por variáveis selecionadas	68
Tabela 19	Sobrevida livre de doença em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis de acordo com variáveis clínicas	71
Tabela 20	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença de acordo com variáveis patológicas e imunoistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53	72
Tabela 21	Lista das variáveis de acordo com a ordem de entrada para análise multivariada de sobrevida livre de doença	73
Tabela 22	Risco de recidiva dos pacientes de acordo com o modelo multivariado por variáveis selecionadas	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
EAU	European Association of Urology
DFS	Disease Free Survival
IC	Intervalo de confiança
NPM	Nucleofosmina
OS	Overall Survival
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RR	Risco relativo
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SG	Sobrevida Global
TNM	Tumor, Nodes, Metastasis

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1	Epidemiologia e aspectos etiológicos.....	3
2.2	Aspectos clínicos e anatomopatológicos.....	5
2.3	Estadiamento.....	7
2.4	Tratamento do tumor primário.....	11
2.5	Linfadenectomias.....	13
2.6	Fatores prognósticos e preditivos de metástases linfonodais.....	16
2.7	Nucleofosmina.....	20
2.7.1	Estrutura molecular.....	21
2.7.2	Modificações pos translacionais.....	22
2.7.3	Interações com outras moléculas.....	24
2.7.4	Nucleofosmina e prognóstico em câncer.....	24
2.8	p53.....	26
2.9	Ki67.....	35
3	OBJETIVOS.....	40
4	CASUÍSTICA E METODOS.....	41
4.1	Casuística.....	41
4.1.1	Critérios de inclusão.....	41
4.1.2	Critérios de exclusão.....	41
4.2	Métodos.....	42
4.2.1	Dados clínicos e anatomopatológicos.....	42
4.2.2	Técnica de Imunoistoquímica.....	43
4.2.3	Análise Estatística.....	47
5	RESULTADOS.....	49

5.1	Dados clínicos e demográficos	49
5.2	Aspectos cirúrgicos	52
5.3	Características patológicas do tumor primário.....	53
5.4	Expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53 e associação com fatores clínicos e patológicos	54
5.5	Análise do risco de metástases linfonodais.....	61
5.6	Análise de sobrevida global	64
5.7	Análise de sobrevida livre de doença.....	70
6	DISCUSSÃO.....	76
6.1	Aspectos gerais	76
6.2	Aspectos clínicos e etiopatológicos	77
6.3	Aspectos cirúrgicos	78
6.4	Expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, ki67 e p53 e associação com características anatomopatológicas	80
6.5	Análise do risco de metástases linfonodais.....	83
6.6	Análise de sobrevida global	85
6.7	Análise de sobrevida livre de doença.....	87
7	CONCLUSÕES	89
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICE

Apêndice 1 Ficha de levantamento de dados.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pênis tem incidência significativa especialmente em países do terceiro mundo. Uma das maiores incidências é encontrada na Índia, com taxas de 3,32 casos/100000 habitantes, e as menores incidências entre judeus nascidos em Israel, onde a ocorrência é próxima a zero (SOLSONA et al. 2004).

No nosso meio representa 2,1% das neoplasias do sexo masculino. Em regiões como o norte e o nordeste tem frequência relativa de 5,3 % e 5,7% respectivamente (BRUMINI 1982).

As metástases linfonodais não tratados podem ulcerar ou se fixar ao feixe vâsculo-nervoso. A morte desses pacientes ocorre devido a sepsis, hemorragia por ruptura dos grandes vasos e caquexia. Quando não tratados, o óbito ocorre no período de até 2 anos (BEGGS e SPRATT 1964).

Os pacientes portadores de metástases linfonodais podem ser curados com as linfadenectomias em cerca de 20% a 60% dos casos (HEYNS et al. 2010). No entanto, esse tratamento está associado a um alto índice de complicações, que varia de 30 a 90% (LOPES et al. 1996a, ORNELLAS 2008b; BEVAN-THOMAS et al. 2002).

A avaliação da extensão do acometimento linfonodal continua baseada no exame clínico e está associada a muitas dificuldades. Exames complementares de imagem não conseguem predizer de forma confiável micrometástases em linfonodos normais (KRISHNA et al. 2008; LEIJTE et al. 2009; SCHLENKER et al. 2012).

O estudo de fatores prognósticos do tumor primário pode ajudar na seleção dos pacientes candidatos às linfadenectomias. O aumento da expressão imunohistoquímica do ki-67, do p53 e da nucleofosmina têm sido associados a pior prognóstico em diversas neoplasias (COUTINHO-CAMILLO et al. 2010). Poucos estudos avaliaram o valor da expressão imunohistoquímica do p53 e Ki67 em câncer de pênis e apresentam resultados muitas vezes conflitantes (FARIA et al. 2000; GUIMARÃES et al. 2007; GIL et al. 2002; LOPES et al. 2002). Não temos conhecimento até o momento sobre algum estudo que avalie a expressão da nucleofosmina em câncer de pênis.

No presente estudo avaliamos o valor da expressão imunohistoquímica da nucleofosmina, p53 e Ki67 como fatores prognósticos em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS ETIOLÓGICOS

O câncer de pênis tem incidência significativa em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Uma das maiores incidências é encontrada na Índia, com taxas de 3,32 casos/100000 habitantes, e as menores incidências entre judeus nascidos em Israel, onde a ocorrência é próxima a zero (SOLSONA et al. 2004). Ainda na Índia, os tumores do pênis representam 11,6 % dos tumores genitais que acometem os homens (TAKIAR e KUMAR 2014).

No Brasil, representa 2,1% das neoplasias do sexo masculino. Em regiões como o norte e o nordeste tem freqüência relativa de 5,3 % e 5,7% respectivamente; (BRUMINI 1982). Levantamento mais recente descreve maior incidência nas regiões norte e nordeste e sudeste, com 53,02% e 45,54% dos casos respectivamente (FAVORITO et al. 2008).

Nos países desenvolvidos a ocorrência dessa doença é baixa. Nos Estados Unidos a incidência é de 0,69 caso para 100000 habitantes, com maior freqüência entre hispânicos, entre os quais é de 1,01 caso para 100000 habitantes (BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007).

A incidência do câncer de pênis é maior a partir da quarta década de vida, mas mesmo indivíduos muito jovens, com menos de 25 anos, podem ser acometidos pela moléstia (LOPES et al. 1996a; BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007; FAVORITO et al. 2008).

Esta neoplasia não parece estar associada a diferenças raciais (RIVEROS e LEBRÓN 1963; BEGGS e SPRATT 1964).

Uma revisão sistemática da literatura apontou como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pênis a fimose, o tabagismo, o hábito de mascar tabaco, ferimentos e processos inflamatórios crônicos do pênis, verrugas genitais e infecção por HPV de alto risco (POW-SANG et al. 2010).

Algumas lesões que acometem a glândula e o prepúcio são consideradas precursoras do carcinoma epidermóide do pênis, tais como: papulose bowenóide, balanite xerótica obliterante, neoplasia intraepitelial grau III, condiloma gigante, eritroplasia de Queyrat, doença de Bowen e doença de Paget (HAKENBERG et al. 2015).

Fatores como baixa condição socio-econômica e hábitos de higiene pessoal precários podem também aumentar significativamente a chance de ocorrência da doença (MICALI et al. 2006). O hábito de manter relações sexuais com animais também já foi apontado como fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pênis (ZEQUI et al. 2012).

As lesões tumorais se originam mais frequentemente na glândula e prepúcio, mas podem acometer também a haste peniana (BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007).

A associação entre a infecção por alguns tipos de HPV e o desenvolvimento de câncer de pênis tem sido sugerido na literatura, tanto por trabalhos epidemiológicos descritos por BRINTON et al. (1991) como por trabalhos de biologia molecular (VILLA e LOPES 1986; BEZERRA et al. 2001; SCHEINER et al. 2008). A prevalência do DNA do HPV no câncer de pênis varia de 20% a 80%, dependendo da população estudada e dos métodos de detecção utilizados. O subtipo

mais comum é o 16, encontrado em até 69% dos espécimes. O mecanismo de indução da carcinogênese se dá provavelmente pela interação com oncogenes e genes supressores de tumor, como o gene do retinoblastoma e p53, respectivamente (KAYES et al. 2007a).

2.2 ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS

A forma de apresentação mais comum do câncer de pênis é um nódulo ou úlcera que não cicatriza, podendo ser acompanhado de sangramento e dor. Pode haver áreas de eritema ou lesões verrucosas. As lesões se localizam preferencialmente na glândula, prepúcio e sulco coronal. Podem crescer de forma exofítica ou infiltrativa (LOPES et al. 1996a; POW-SANG et al. 2002; MICALI et al. 2004).

Sintomas sistêmicos como fadiga, perda de peso, fraqueza e mal estar só costumam aparecer como decorrência de supuração crônica da lesão primária ou dos sítios de metástases (MISRA et al. 2004).

O tempo de evolução da doença pode ser bastante longo. Alguns pacientes são diagnosticados após mais de 12 meses de evolução (LOPES et al. 1996a; POW-SANG et al. 2002, FAVORITO et al. 2008). Os motivos apontados para tal delonga são baixo nível de instrução, medo ou pudor e dificuldade de acesso ao sistema de saúde (FAVORITO et al. 2008).

O exame físico deve incluir a palpação da lesão primária para que se possa caracterizar a sua forma, diâmetro e localização. Deve-se palpar também os corpos cavernosos para avaliar se há extensão do tumor a estas estruturas. A palpação das

regiões inguinais é fundamental para a avaliação de possíveis metástases (HAKENBERG et al. 2015).

O diagnóstico de certeza é obtido através da biópsia da lesão primária e exame anatomopatológico. Essa biópsia deve ser realizada englobando parte da lesão e parte de tecido são, evitando áreas de necrose (MISRA et al. 2004). Nas lesões que acometem o meato é importante avaliar a possibilidade de invasão da uretra (GUIMARÃES et al. 2011).

O carcinoma epidermóide do pênis se assemelha ao carcinoma epidermóide de outras regiões do corpo. Atualmente vários subtipos histológicos são reconhecidos e outras variantes continuam a ser descritas. Entre os tipos mais aceitos, podemos citar os nomes e frequências relativas das diversas variantes do carcinoma epidermóide do pênis: carcinoma epidermóide usual (48% a 65%), basalóide (4 a 10%), warty (7% a 10%), verrucoso (3% a 8%), papilar (5% a 15%), sarcomatóide (1% a 3%), tipos mistos (9% a 10%), pseudoiperplásico (<1%), cuniculatum (<1%), pseudoglandular (<1%), warty-basaloide (9% a 14%), adenoescamoso (<1%), mucoepidermóide (<1%), variante células claras (1%-2%) (CHAUX et al. 2010; HAKENBERG et al. 2015). O reconhecimento dos subtipos histológicos é de suma importância, pois tem implicações claras no prognóstico (GUIMARÃES et al. 2009).

A descrição do exame anatomopatológico, incluindo esses tipos histológicos e características relevantes do tumor primário e linfonodos ressecados encontram-se padronizadas (VELAZQUEZ et al. 2010).

Outros tipos histológicos menos frequentes são melanomas, carcinomas basocelulares, sarcomas, e lesões metastáticas e não serão abordados neste trabalho (BRACKEN e DIOKNO 1974; ROBEY e SCHELLHAMMER 1984).

Apesar dessa neoplasia ocorrer em um órgão extremamente vascularizado, as metástases hematogênicas são raras, ocorrendo em torno de 1 a 10% dos casos. A disseminação ocorre principalmente por via linfática (LOPES et al. 1996a e b, LEIJTE et al. 2008; ORNELLAS et al. 2008a e b).

A drenagem linfática do pênis se dá inicialmente para os linfonodos inguinais superficiais e profundos. Estes são os primeiros sítios de disseminação da doença, seguidos por linfonodos ilíacos e então metástases à distância (CATALONA 1980; FRALEY et al. 1985).

As metástases linfonodais quando não tratadas podem ulcerar ou se fixar ao feixe vaso-nervoso. A morte desses pacientes ocorre devido a sepsis, hemorragia por ruptura dos grandes vasos e caquexia. Quando não tratados, o óbito ocorre no período de até 2 anos (BEGGS e SPRATT 1964). Não há relato de remissão espontânea.

2.3 ESTADIAMENTO

O estadiamento consiste em avaliar a extensão da doença do ponto de vista local, regional e à distância. É fundamental para definição da terapêutica a ser instituída e para prever o prognóstico dos pacientes.

Em 2009 foi publicada a sétima edição do estadiamento TNM, utilizada nesse trabalho (EDGE et al. 2009).

Quadro 1 - Sistema de classificação do tumor de pênis - TNM, AJCC 2009.

T - Tumor Primário
Tx - Tumor primário não avaliado
T0 - Sem evidência de tumor
Tis - Carcinoma in situ
Ta - Tumor verrucoso não invasivo
T1a - Tumor invade tecido conectivo subepitelial sem invasão vascular e é bem diferenciado (ex.: tumores grau 1 ou 2)
T1b - Tumor invade tecido conectivo subepitelial com invasão vascular ou é pouco diferenciado (ex.: tumores de grau 3 ou 4)
T2 - Tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso
T3 - Tumor invade uretra
T4 - Tumor invade estruturas adjacentes
N - Linfonodos Regionais
* Definição do Estadiamento Clínico - baseada em palpação e imagem
cNx - Linfonodos regionais não avaliados
cN0 - Sem linfonodos palpáveis ou visivelmente aumentados
cN1 - Linfonodo inguinal unilateral móvel e palpável
cN2 - Linfonodos inguinais bilaterais ou múltiplos móveis e palpáveis
cN3 - Massa nodal inguinal fixa e palpável ou linfadenopatia pélvica uni ou bilateral
* Definição do Estadiamento Patológico
pNx - Linfonodos regionais não avaliados
pN0 - Sem metástase nos linfonodos
pN1 - Metástase em um único linfonodo inguinal
pN2 - Metástase em linfonodos inguinais bilaterais ou múltiplos
pN3 - Extensão extranodal de metástases linfonodais ou de linfonodos pélvicos uni ou bilaterais (cont.)
M - Metástases a Distância
M0 - Sem metástase a distância
M1 - Com metástase a distância
G - Grau histopatológico
Gx - grau histopatológico não pode ser avaliado
G1 - bem diferenciado
G2 - moderadamente diferenciado
G3-4 - pobre diferenciação/indiferenciado

Fonte: EDGE et al. (2009)

Quadro 2 - Estádios separados conforme a Classificação da AJCC

Estadio I
T1a, N0, M0
Estadio II (qualquer um dos seguintes)
T1b, N0, M0
T2, N0, M0
T3, N0, M0
Estadio IIIa
T1-3, N1, M0
Estadio IIIb
T1-3, N2, M0
Estadio IV (qualquer um dos seguintes)
T4, qualquer N, M0
qualquer T, N3, M0
qualquer T, qualquer N, M1

Fonte: EDGE et al. (2009)

O estadiamento clínico do câncer de pênis baseia-se principalmente no exame físico. Em relação ao tumor primário, o exame físico é confiável. A realização de ultrassonografia e ressonância nuclear magnética após a indução medicamentosa da ereção pode ser útil na avaliação da invasão dos corpos cavernosos nos casos duvidosos pelo exame físico (LONT et al. 2003; KAYES et al. 2007b). No entanto, tratam-se de exames de disponibilidade limitada e onerosos, além de dispensáveis na imensa maioria dos casos.

A avaliação da extensão do acometimento linfonodal da doença, apesar dos avanços dos métodos diagnósticos, também continua baseada no exame clínico e está associada a muitas dificuldades. A ultrassonografia, a tomografia computadorizada, a ressonância nuclear magnética e a tomografia com emissão de positrons utilizando

18 desoxifluoroglicose (PET-CT com 18 FDG) não são capazes de identificar de forma confiável micrometástases em linfonodos normais (KRISHNA et al. 2008; LEIJTE et al. 2009; SCHLENKER et al. 2012). Podem ser úteis em pacientes obesos em que a palpação dos linfonodos é dificultada pelo panículo adiposo (HAKENBERG et al. 2015)

Uma forma de estadiamento cirúrgico para os linfonodos regionais do pênis foi proposto por CABANAS (1977). Em um estudo baseado em linfangiografias realizadas através dos vasos linfáticos dorsais do pênis, esse autor propôs o conceito de linfonodo sentinela (LS), localizado na região ântero-medial da veia epigástrica superficial. Este seria o primeiro sítio de metástases linfonodais. Analisou 46 pacientes nos quais a biópsia do linfonodo sentinela foi realizada e verificou que em 15 deles a biópsia foi positiva. Dentre esses últimos 12 deles (80%) não tinham nenhum outro linfonodo comprometido. No grupo de 31 pacientes com biópsia inicial negativa, não foram observadas metástases inguinais subsequentes e a sobrevida em 5 anos foi de 90%.

Esses resultados foram contestados posteriormente. WESPES et al. (1986) demonstraram desenvolvimento de metástases em linfonodos inguinais profundos e ilíacos após biópsia negativa do linfonodo sentinela, encontrando resultados falso-negativos em até 22% dos casos.

O mapeamento da drenagem linfática com tecnécio 99 não coloidal para identificação do linfonodo sentinela, técnica conhecida como linfocintilografia, parece ser procedimento de valor. HORENBLAS et al. (2000) analisaram 55 pacientes portadores de carcinoma de pênis invasivo submetidos à linfocintilografia.

Na média de seguimento de 22 meses, apenas um paciente que teve a biópsia do linfonodo sentinela negativa desenvolveu metástases.

Esse mesmo grupo publicou posteriormente a análise dos resultados da linfocintilografia no estadiamento de 90 pacientes portadores de câncer de pênis e encontraram uma sensibilidade de 80%. Nessa casuística 23 pacientes tiveram a biópsia do linfonodo sentinela negativa, dos quais 5 pacientes apresentaram recidiva ao longo do seguimento (TANIS et al. 2002). Modificações no método introduzidos posteriormente reduziram o índice de falsos negativos para 4,8% (LEIJTE et al. 2007).

Esse método pode ser útil em pacientes com linfonodos clinicamente negativos desde que se disponha do material adequado e de equipe treinada.

2.4 TRATAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO

O objetivo do tratamento do tumor primário é a sua remoção com margens, preservando a maior extensão possível do órgão. O tipo de cirurgia mais utilizada para lesões com estadiamento igual ou maior a T2 ainda é a amputação do pênis, seja ela parcial ou total, o que permite bom controle local da doença (LEIJTE et al. 2008; GUIMARÃES et al. 2011, HAKENBERG et al. 2015). O índice de recidiva local é de cerca de 5% e este evento não parece afetar de forma significativa a sobrevida dos pacientes (LEIJTE et al. 2008).

A margem cirúrgica tradicionalmente utilizada é de 2,0 cm. Mais recentemente, margens de 1,0 cm ou até menores tem sido relatadas com índices de recidiva em torno de 4% (MINHAS et al. 2005).

Para lesões que infiltram a base do pênis, quando não é possível oferecer margem de segurança adequada e manter um coto peniano de pelo menos 2,0 cm, que permita ao paciente micção em posição ortostática, a amputação total do pênis e reimplante uretral no períneo se faz necessária (HOPPMANN e FRALEY 1978; GUIMARÃES et al. 2011).

Lesões de até 1,0 cm, estadio menor ou igual a T1 e de baixo grau, teoricamente podem ser tratadas com ressecções econômicas descritas por MOHS et al. (1985). Esse método é difícil de reproduzir e oneroso. Além disso, em nosso meio, muitos pacientes se apresentam em fase localmente avançada da doença ao diagnóstico (LOPES et al. 1996a).

Para tumores estadio Tis ou T1, o tratamento com laser de CO2 é uma boa opção. Uma série de pacientes tratados dessa forma apresentou índices de recidiva de 17,5% em 10 anos, enquanto que a taxa de amputações de resgate foi de apenas 5,5 % no mesmo período (BANDIERAMONTE et al. 2008).

A braquiterapia para controle do tumor primário também tem sido utilizada por alguns centros, idealmente em tumores menores que 4,0 cm e que penetrem em menos de 1,0 cm na profundidade. Uma série de 67 pacientes tratados com esse método apresentou uma taxa de sobrevida câncer específica em 10 anos de 83,6%, com uma taxa de preservação do órgão de 67% no mesmo período. Como principais complicações os autores relataram necrose de tecidos moles do pênis em 12% dos pacientes e estenose de uretra em 9% (CROOK et al. 2009). Nesta mesma publicação, os autores fazem um levantamento de grandes séries de radioterapia externa para tratamento do tumor primário do pênis e relatam taxas de sobrevida

câncer específica de 58% a 88% em 5 anos e preservação do órgão em 50% a 66% dos pacientes.

2.5 LINFADENECTOMIAS

O principal sítio de metástases são os linfonodos regionais. Essas metástases linfonodais tendem a ulcerar a pele e infectar ou infiltrar o feixe vasculo-nervoso subjacente. Se não tratados, evoluem para óbito num período de 2 anos em decorrência de caquexia, sangramento ou sepse (DERRICK et al. 1973).

Os pacientes portadores de metástases linfonodais podem ser curados com as linfadenectomias em cerca de 20% a 60% dos casos (HEYNS et al. 2010). A chance de cura parece ser maior naqueles com até 3 linfonodos inguinais comprometidos, sem rotura capsular e sem comprometimento de linfonodos ilíacos (RAVI 1993). No entanto, esse tratamento está associado a um alto índice de complicações, que varia de 30 a 90% (LOPES et al. 1996a e b, ORNELLAS 2008 a e b; BEVAN-THOMAS et al. 2002)

As maiores controvérsias surgem em relação aos critérios de seleção, extensão do procedimento e ao melhor momento para a realização das linfadenectomias.

É bem conhecido o fato de que a infecção do tumor primário pode levar à linfadenomegalia nas regiões inguinais. Por isso muitos serviços preconizam o tratamento da lesão primária seguido de antibioticoterapia por período de 4 a 8 semanas antes da abordagem cirúrgica dos linfonodos (LOPES et al. 1996a). Tal conduta vem sendo questionada mais recentemente e alguns autores recomendam o

uso de antibióticos apenas se houver infecção do tumor primário (HEYNS et al. 2010).

Entre os pacientes que continuam apresentando linfonodos clinicamente palpáveis após esse tratamento, cerca de 50% têm realmente metástases comprovadas pelo estudo anatomopatológico. Por outro lado, cerca de 20% dos pacientes com linfonodos não palpáveis apresentam metástases linfonodais histologicamente comprovadas (BEGGS e SPRATT 1964; CATALONA 1988).

Nesses pacientes com linfonodos clinicamente negativos, alguns autores recomendaram conduta inicial expectante, com seguimento rigoroso e realização de linfadenectomias apenas se surgirem linfonodos palpáveis ao longo do seguimento. Isso se justificaria pela grande quantidade de pacientes submetidos desnecessariamente a um procedimento de grande morbidade, além do que a linfadenectomia de resgate não comprometeria a sobrevida (EKSTROM e EDSMYR 1958; BEGGS e SPRATT 1964).

No entanto, alguns autores sugeriam a linfadenectomia sistemática em todos os pacientes após o tratamento do tumor primário invasivo. Isso se justificaria pelo alto índice de mortalidade nos pacientes tratados tardiamente (HOPPMANN e FRALEY 1978; CATALONA 1988).

A recomendação atual é a indicação da linfadenectomia profilática segundo fatores de risco. Na maioria das séries, são dispensados das linfadenectomias profiláticas pacientes com estadio até T1, com tumor bem diferenciado e sem invasão linfovascular (GUIMARÃES et al. 2011; HAKENBERG et al. 2015). Para os outros grupos a recomendação é a linfadenectomia profilática. Tal conduta se

justifica pelo fato de que as linfadenectomias tardias estão associadas a pior sobrevida (ORNELLAS et al. 2008a; PROTZEL et al. 2009; HEYNS et al. 2010).

Uma vez indicado, o procedimento deve ser bilateral, pois cerca de 30% desses pacientes portadores de tumor invasivo apresentam comprometimento linfonodal bilateralmente (EKSTROM e EDSMYR 1958; LOPES et al. 1996a e b).

Na tentativa de diminuir a morbidade relacionada ao procedimento, CATALONA (1988) propôs modificação na técnica da linfadenectomia, realizando um procedimento mais econômico, de forma a dissecar inicialmente apenas os linfonodos superficiais do quadrante súpero-medial, poupando a veia safena. Caso esses linfonodos se mostrassem positivos, a linfadenectomia clássica seria realizada. Essa técnica se mostrou pouco confiável como demonstrado por LOPES et al. (1996b).

A linfadenectomia inguinal realizada por acesso videoendoscópico foi proposto por TOBIAS-MACHADO et al. (2006). O objetivo é reduzir as complicações do procedimento, especialmente aquelas relacionadas à incisão. O procedimento se mostrou factível e reproduzível em outros centros (SOTELO et al. 2007). No entanto, estudos com maior tempo de seguimento e maior casuística são necessários para comprovação dos resultados oncológicos a longo prazo (HEYNS et al. 2010; HAKENBERG et al. 2015).

Caso haja comprometimento dos linfonodos inguinais, haverá também comprometimento de linfonodos pélvicos em cerca de 15 a 30% das vezes (SRINIVAS et al. 1987; LOPES et al. 1996a). Cabe observar, no entanto, que a ocorrência de metástases para os linfonodos pélvicos sem antes haver comprometimento tumoral dos linfonodos inguinais é evento raro (ABI-AAD e

DEKERNION 1992). A linfadenectomia ilíaca parece oferecer maior benefício apenas para os pacientes portadores de até um linfonodo ilíaco comprometido, sem extensão extra linfonodal. O procedimento pode ser realizado por acesso videolaparoscópico, poupando os pacientes da morbidade da incisão (LOPES et al. 2000; HEYNS et al. 2010).

Pacientes não submetidos inicialmente a linfadenectomia e que não apresentem metástases linfonodais em um período igual ou superior a três anos, podem ser considerados N0. A ocorrência de metástases linfonodais após esse período de seguimento é evento bastante raro (SORIA et al. 1997; PIZZOCARO et al. 2010).

Exames de imagem como a tomografia computadorizada ou a ressonância nuclear magnética podem ser úteis na avaliação da extensão da doença linfonodal nas cadeias ilíacas (HEYNS et al. 2010)

Diante do exposto, fica evidente a dificuldade na seleção dos pacientes candidatos às linfadenectomias. Isso pode ser feito através do estudo das características clínicas, anatomopatológicas e biológicas dos tumores primários a fim de estabelecermos fatores preditivos da ocorrência de metástases linfonodais.

2.6 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DE METÁSTASES LINFONODAIS

Muitas variáveis clínicas e patológicas, e mais recentemente de biologia molecular, vêm sendo estudadas para prever a evolução dos pacientes portadores de carcinoma do pênis.

Dentre todos os fatores prognósticos, o mais importante até o momento é o envolvimento metastático dos linfonodos (LOPES et al. 1996a; ORNELLAS et al. 2008 a e b; LEIJTE et al. 2008). ORNELLAS et al. (2008a) relatam taxas de sobrevida em 10 anos de 35% e 96% para pacientes com e sem metástases linfonodais, respectivamente. Dados muito semelhantes foram relatados por LOPES et al. (1996a).

A extensão do envolvimento linfonodal também parece ser fator relevante na sobrevida dos pacientes (SRINIVAS et al. 1987). Em uma série de 103 pacientes, onde todos apresentavam comprometimento linfonodal, a sobrevida câncer específica em 10 anos foi de 71% contra 53,7% em pacientes com menos de 15% de linfonodos comprometidos contra aqueles com mais de 15% (DA COSTA et al. 2015). Este último trabalho sugere que não só o número de linfonodos comprometidos, mas a sua porcentagem em relação ao total daqueles ressecados, é importante.

O estadio do tumor primário também se correlaciona com a sobrevida. HORENBLAS et al. (1991) estudando 110 casos, verificaram que a sobrevida em 10 anos dos pacientes com estágio T1 foi de 94%, enquanto que para os pacientes com estágio T3 foi de 64% ($p=0,0036$). De forma semelhante, o estadio do tumor primário se correlaciona com o risco de metástases linfonodais (SOLSONA et al. 1992).

LOPES et al. (1996a), estudando fatores clínicos e anatomopatológicos de 145 pacientes portadores de câncer de pênis, constataram que a presença de embolização vascular é outro fator prognóstico significativo relacionado ao tumor

primário. Neste estudo, a espessura do tumor só foi significativa como fator prognóstico na análise univariada.

O grau de diferenciação do tumor é considerado fator prognóstico importante em vários estudos. Em geral, quanto mais indiferenciado, maior o risco de metástases e pior a sobrevida (LOPES et al. 1996a, ORNELLAS et al. 2008a). Um trabalho recente analisando 163 pacientes com estadiamento clínico N0 e não submetidos a linfadenectomias mostrou que o grau foi o fator prognóstico mais importante. Tumores de alto grau se correlacionaram com um risco de morte pela doença cerca de 14 vezes maior (AITA et al. 2016).

A invasão linfovascular por células tumorais é bem reconhecida como fator de risco para metástases linfonodais e tem sido utilizado como parâmetro para decisão sobre a indicação de linfadenectomias (LOPES et al. 1996a, NOVARA et al. 2007; ORNELLAS et al. 2008b). Tal parâmetro tem sido utilizado para diferenciar os estádios pT1a e pT1b no sistema de estadiamento atualmente utilizado TNM, sétima edição (EDGE et al. 2009)

A infiltração perineural foi descrita em grandes séries de casos como fator preditivo de metastatização linfonodal (CUBILLA et al. 2007; ORNELLAS et al. 2008a) e foi incorporada como fator de risco no consenso da Sociedade Européia de Urologia (HAKENBERG et al. 2015).

Outra característica que se associa a ocorrência de metástases linfonodais é a espessura do tumor, também descrita como profundidade de invasão. Tumores com espessura maior que 5mm, ou seja, que invadem mais profundamente os tecidos do órgão, tendem a gerar mais metástases linfonodais (LOPES et al. 1996a; ORNELLAS et al. 2008a)

O tipo histológico também é um fator prognóstico importante. Um trabalho que analisou fatores clínicos e patológicos em 333 pacientes portadores de câncer de pênis classificou os tipos histológicos em relação ao risco de metástases linfonodais e mortalidade. Em relação ao risco de metástases linfonodais foram considerados de baixo risco os tipos verrucoso, papilar e warty; risco intermediário o carcinoma epidermóide usual e tipos mistos; alto risco as variantes sarcomatóide, basalóide e adenoescamoso. No que se refere à mortalidade, foram considerados de baixo risco os tipos verrucoso, misto, papilar, warty e adenoescamoso; risco intermediário o carcinoma epidermóide usual e basalóide; alto risco apenas o sarcomatóide (GUIMARÃES et al. 2009)

Um outro dado anatomopatológico é o tipo do fronte de invasão do tumor. GUIMARÃES et. al (2006) descreveram dois tipos de padrão de infiltração. No descrito como infiltrativo, blocos tumorais sólidos infiltram amplamente o estroma do órgão. No padrão “pushing”, o tumor mantém uma interface bem delimitada com o tecido são adjacente. O primeiro tipo, “infiltrating” ou infiltrativo, se correlaciona com chance significativamente maior de metástases linfonodais, sendo 64,5 % neste tipo contra 23,5% nos tumores “pushing”. (GUIMARÃES et. al 2006). Essa característica anatomopatológica se mostrou o fator prognóstico mais importante em pacientes com estadio patológico N0, sendo que tumores primários com a característica “infiltrating” estavam associados a um risco de morte pela doença 11,5 vezes maior que aqueles do tipo “pushing” (AITA et. al. 2015).

Os fatores relacionados à biologia molecular do carcinoma de pênis também tem sido estudados. A presença do DNA do HPV no carcinoma primário do pênis

não se correlaciona com o risco de metástases linfonodais, nem com a sobrevida (BEZERRA et al. 2001).

A expressão imunoistoquímica do gene p53 foi analisada por LOPES et al. (2002) em 82 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis. A positividade imunoistoquímica do p53 se associou ao maior risco de metástases para linfonodos regionais, tanto na análise uni como na multivariada. A associação com maior risco de óbito só foi constatado na análise univariada. Constatação semelhante foi feita por GIL et al. (2002).

A expressão imunoistoquímica da caderina-E e metaloproteases 2 (MMP2) e metaloprotease 9 (MMP9) foi estudada no tumor primário de 125 pacientes portadores de câncer de pênis. A diminuição da expressão da caderina E se correlacionou com maior risco de metástases linfonodais na análise univariada e o aumento da expressão da MMP9 foi um fator independente de risco para recidiva (CAMPOS et al. 2006).

2.7 NUCLEOFOSMINA

A nucleofosmina, também denominada B23 (YUNG et al. 1985), numatrina (FEUERSTEIN e MOND 1987) ou NO38 (SCHMIDT-ZACHMANN et al. 1987) foi inicialmente descrita como uma fosfoproteína nucleolar não ribossômica encontrada em grande quantidade na região granular do nucléolo (MAMRACK et. al 1979). Pertence à família das nucleoplasminas e é capaz de atuar como chaperona tanto para proteínas como para ácidos nucleicos. (OKUWAKI et al. 2001)

A nucleofosmina participa de vários processos celulares tais como biogênese do ribossomo, resposta a estímulos que causam estresse celular como radiação ultravioleta ou hipóxia, manutenção da estabilidade genômica e do controle da ploidia celular, assim como processos de reparo do DNA. Participa ainda da regulação da transcrição do DNA através da modulação de processos de condensação da cromatina e ainda está envolvida na regulação da atividade de genes supressores de tumores fundamentais como p53 e ARF. Boa parte das suas funções ainda não são bem compreendidas. Algumas são aparentemente antagônicas. O gene que condiciona a molécula tem funções tanto de oncogene como de supressor de tumor.(GRISENDI et al. 2006; LIM e WANG 2006; OKUWAKI 2008).

A nucleofosmina é essencial para o desenvolvimento embrionário e para a estabilidade genômica. O estudo de camundongos mutantes incapazes de produzir nucleofosmina mostrou que os embriões morriam entre os dias E11.5 e E16.5 da embriogênese devido a anemia severa secundária a defeitos na hematopoiese primitiva. Apresentavam ainda hipodesenvolvimento do proencéfalo. As células embrionárias apresentavam anormalidades centrossômicas, aneuploidias e defeitos na biogênese do ribossomo, o que resultava em morte celular (GRISENDI et al. 2005).

2.7.1 Estrutura molecular

A estrutura da nucleofosmina é altamente conservada em vertebrados e amplamente distribuída nas diversas espécies, com peso molecular que varia de 35 a 40 kDa (LIM e WANG 2006). Em humanos e em ratos a nucleofosmina existe em duas isoformas geradas a partir de um único gene através de “splicing alternativo”.

Esse gene contém 12 exons e está localizado no braço curto do cromossomo 5 (5q35). Essas duas isoformas da nucleofosmina são chamadas de NPM1 e NPM1.2 ou ainda B23.1 e B23.2 e diferem nas suas porções C' terminais em 35 aminoácidos. A NPM1.2 tem 259 aminoácidos e a NPM1 tem 294 (CHANG e OLSON 1990). A NPM1 é predominantemente nucleolar e a NPM1.2 é encontrada em menor quantidade nas células e se distribui de maneira semelhantes entre o núcleo e o citoplasma. Tal fato sugere que a porção C terminal que as diferencia tem importância na distribuição celular da proteína (WANG et al. 1993; OKUWKI et al. 2002).

A análise mais detalhada da estrutura molecular da nucleofosmina permite identificar sequências específicas responsáveis pela sua localização no interior da célula. São elas: “Nuclear export signal” (NES), região sinalizadora de envio da molécula para fora do núcleo, “Nuclear localization signal”, região sinalizadora de manutenção da molécula no interior do núcleo e “Nucleolus localization signal”, região responsável pela localização nucleolar da nucleofosmina. O processo de transporte da molécula entre o núcleo e o citoplasma parece ser direcionado por essas regiões da molécula (WANG et al. 2005) (Figura)

2.7.2 Modificações pós translacionais

Vários trabalhos sugerem que a molécula da nucleofosmina existe na forma de monômero ou oligômero. Este último é na verdade um hexâmero e uma forma pode ser convertida na outra. (SCHMIDT-ZACHMAN et al. 1987; YUNG e CHAN 1987). Esse processo de oligomerização parece ser importante para a sua capacidade de se ligar ao DNA. Quando grande quantidade de monômeros estão presentes, a

nucleofosmina se liga com grande afinidade ao DNA, enquanto em condições em que o hexamero predomina, a sua capacidade de se ligar ao DNA fica praticamente abolida (HERRERA et al. 1996).

A nucleofosmina possui vários sítios de fosforilação, principalmente na porção central da sua molécula. Ela é fosforilada por diferentes quinases como CKII (casein kinase II), N-II quinase (Nuclear Kinase II), Plk (polo like kinase) e CDC2 (cdc2 type kinase) (JONES et al. 1981; CHAN et al. 1990; FEUERSTEIN e RANDAZZO 1991; PETER et al. 1990).

A nucleofosmina também sofre fosforilação pelo complexo CDK2/ciclina E (ciclina dependente de quinase 2/ciclina E) no aminoácido treonina 199. As moléculas de nucleofosmina encontram-se ligadas ao centróssomo, mas após sofrer fosforilação nesse sítio, ao final da fase G1 da mitose, dissociam-se do centróssomo, o que possibilita o início do processo de duplicação deste último. Após esse processo de duplicação, a nucleofosmina sofre novamente fosforilação, desta vez pelo complexo CDK1/ciclina B (ciclina dependente de quinase 1/ciclina B), nos seus aminoácidos treonina 234 e 237 e novamente se associa ao centróssomo, impedindo que ocorra nova duplicação. Essa é uma das maneiras pela qual a nucleofosmina atua na manutenção da estabilidade genômica. A expressão de moléculas mutantes de nucleofosmina que não podem ser fosforiladas, impedem a duplicação do centróssomo, já que a ligação entre nucleofosmina e centróssomo não se desfaz (OKUDA et al. 2000; LIM e WANG 2006).

Outro trabalho mostrou que a fosforilação da nucleofosmina em resíduos de serina 4 pela enzima Plk1, também pode interferir na duplicação do centróssomo. A interferência da fosforilação nesta região da molécula utilizando células HeLa

portadoras de mutações responsáveis por alterações nestes sítios de fosforilação ocasiona aberrações na duplicação e segregação do centróssomo e portanto, na citocinese (ZHANG et al. 2004).

2.7.3 Interações com outras moléculas

A nucleofosmina tem interações também com p14ARF (alternate reading frame), proteína envolvida na regulação da progressão do ciclo celular na fase G1. Essa proteína p14ARF age sequestrando a enzima MDM2 para o nucléolo (WEBER et al. 1999). MDM2, por sua vez, age degradando a proteína p53, inibindo a sua ação. Ao inibir MDM2, p14ARF estabiliza a função de p53, que ativa vias de parada do ciclo celular e apoptose (KAMIJO et al. 1997). A nucleofosmina se associa e estabiliza ARF em complexos moleculares de alto peso molecular no interior do nucléolo, retardando a degradação de ARF (KUO et al. 2004). Esses achados sugerem que a perda da função da nucleofosmina pode acelerar o processo de formação tumoral, por causa da inativação de ARF, que por sua vez é capaz de inibir a progressão do ciclo celular tanto por vias dependentes quanto independentes de p53 (SHERR 2001). Isso mostra que a nucleofosmina participa da resposta ao estresse celular mediada por p14ARF, o que confere à nucleofosmina o papel de gene supressor de tumor (GRISENDI et al. 2006).

2.7.4 Nucleofosmina e prognóstico em câncer

O aumento da expressão do RNAm da nucleofosmina se associa a maior risco de recidiva e progressão da doença em câncer de bexiga (TSUI et al. 2004). Esse mesmo autor analisou posteriormente a expressão imunohistoquímica da

nucleofosmina também em carcinoma urotelial de bexiga e mostrou que o aumento da expressão dessa proteína se associava positivamente com o grau histológico, estágio do tumor e com o risco de recidiva (TSUI et al. 2008).

O aumento da expressão do RNA-m da nucleofosmina também foi detectado em câncer de estômago (TANAKA et al. 1992). Nesse trabalho os autores não analisaram correlação com prognóstico. Um outro estudo analisou a expressão proteica da nucleofosmina através de Western-blot e imunoistoquímica como também a expressão do RNA através de RT-PCR em câncer gástrico. A diminuição da expressão da nucleofosmina se correlacionou com maior risco de metástases à distância e com tipos histológicos mais agressivos (LEAL et al. 2014).

O aumento da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina avaliado por “tissue microarray” em 73 pacientes portadoras de câncer de ovário se correlacionou com menor sobrevida (LONDERO et al. 2014).

Como citamos anteriormente, a expressão da nucleofosmina, do Ki-67 e do p53 foram analisadas em pacientes portadores de carcinoma escamoso da cavidade oral. Nessa casuística, o aumento da expressão da nucleofosmina mostrou associação com maior risco de recidiva local e pior sobrevida. A análise multivariada mostrou a nucleofosmina como um fator prognóstico independente neste tipo de tumor (COUTINHO-CAMILLO et al. 2010).

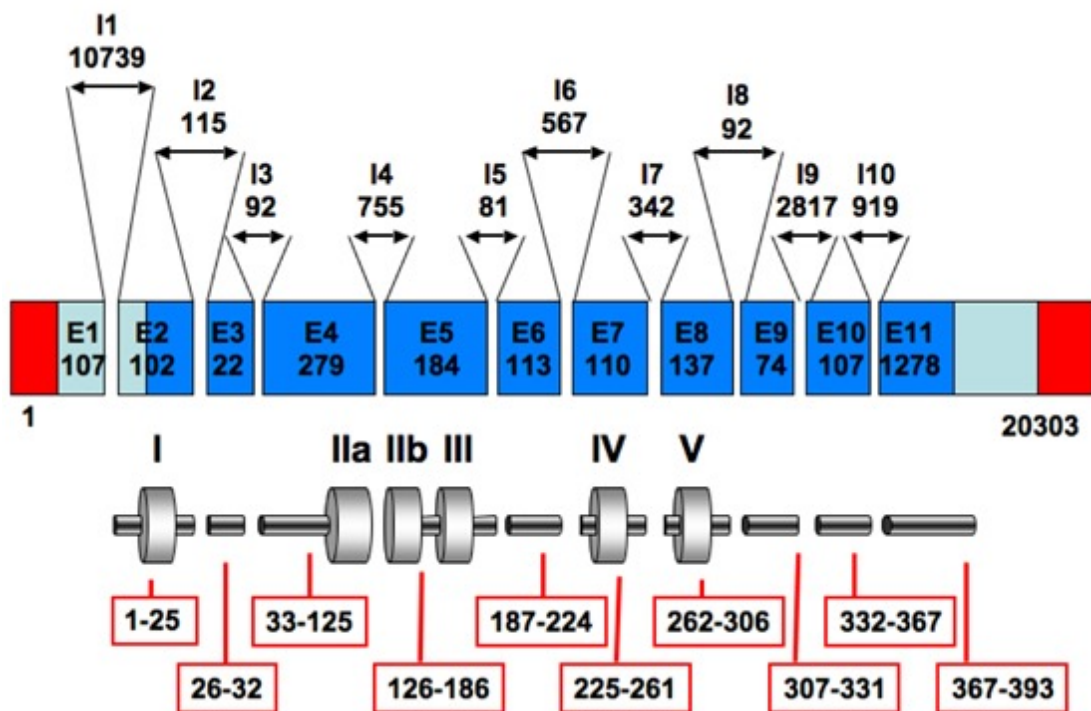
As translocações envolvendo o cromossomo 5 são muito comuns em tumores hematológicos e podem gerar proteínas anormais como ALK-NPM em linfomas não-Hodgkin (MORRIS et al. 1994). Podem ocorrer também translocações t(5,17) em leucemia promielocítica aguda (REDNER et al. 1996) e translocações (t3,5) em

síndromes mielodisplásicas e leucemias mielóides agudas (YONEDA-KATO et al. 1996).

Não encontramos até o momento, nenhum estudo avaliando a expressão da nucleofosmina em câncer de pênis. Este projeto contribui a preencher essa lacuna do conhecimento e tem caráter inédito.

2.8 p53

O p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53 Kda, com 375 aminoácidos, codificada por um gene mapeado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) (LAMB e CRAWFORD 1986) (Figura 1). A proteína p53 foi originalmente descrita em extratos de células transformadas, complexada com proteínas do vírus SV40 (LANE e CRAWFORD 1979), e foi considerada um antígeno tumoral. Durante a década de 1980 foram isolados vários clones de DNA codificantes da proteína p53 que eram capazes de transformar células quando combinados com o oncogene Ras (ELIYAHU et al. 1984; ELIYAHU et al. 1985; PARADA et al. 1984). Diante desses achados, o p53 foi considerado um oncogene (LANE e LEVINE 2010).



Fonte: http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html

Figura 1 - Representação esquemática do gene p53. Acima observamos os exons E1-E11 e os introns I1-I10. Abaixo, na figura, vemos os domínios evolutivamente conservados I-V.

No final da década de 1980, ficou claro que essas sequências de DNA capazes de transformar células em cultura continham mutações e que o DNA selvagem era capaz de evitar a transformação causada pelos oncogenes em células em cultura (FINLAY et al. 1989). Além disso, mutações em ambos os alelos do p53 foram identificados em tumores de camundongos (WOLF e ROTTER 1984), em linhagens de células humanas em culturas (WOLF e ROTTER 1985) e no DNA de células tumorais de carcinomas colorretais em humanos (BAKER et al. 1989). Essas observações em conjunto levaram à classificação do p53 selvagem como gene supressor de tumor (LANE e LEVINE 2010). Isso pode ser confirmado por quatro observações: (1) humanos que herdam um alelo mutante do gene manifestam a

síndrome de Li-Fraumeni e desenvolvem cânceres ao longo de sua vida com 100% de penetrância, alguns deles manifestam vários tumores independentes (MALKIN et al. 1990). (2) Camundongos que apresentam mutações com perda de função do gene p53 (knockout) desenvolvem tumores ainda muito jovens (DNEHOWER et al. 1992). (3) Até cerca de 50% de todos os cânceres humanos apresentam mutações do gene p 53 (KANDOTH et al. 2013). (4) A proteína p53 encontra-se expressa em níveis anormalmente elevados em vários tipos de tumores (BÁRTEK et al. 1991).

O gene p53 é, portanto, considerado supressor de tumor. A sua atividade supressora depende de sua participação como fator de controle da transcrição de genes relacionados a proliferação celular, reparo a danos no DNA e apoptose. O seu efeito final é evitar a replicação de células mutantes (LANE 1992).

Como citado anteriormente, a mutação germinativa no gene p53 leva à síndrome de Li-Fraumeni, na qual os indivíduos afetados tem predisposição a vários tipos de tumores, que se manifestam em idade precoce. É freqüente no fenótipo dos indivíduos afetados o desenvolvimento de sarcomas de partes moles antes dos 45 anos de idade, assim como carcinomas de mama antes da menopausa, tumores do córtex da adrenal, leucemias e vários tipos de tumores cerebrais. Essa síndrome foi descrita inicialmente em 1969 e a correlação com p53 descrita em 1990 (MALKIN 2011).

A proteína p53 se liga a várias sequências específicas de DNA em genes que contenham elementos responsivos a essa proteína (FUNK et al. 1992) e promove o aumento da transcrição desses genes (FARMER et al. 1992). São muitos os genes cuja transcrição é controlada por p53 e o conhecimento a esse respeito aumenta a cada dia.

A ativação do p53 pode levar à parada do ciclo celular através do aumento da transcrição de p21 e de GADD45 (HUNTER et al. 1994). Da mesma forma, p53 ativado pode induzir células ao processo de apoptose através da indução das proteínas bax, puma, noxa e apaf-1 (SHAW et al. 1992). Todos esses processos podem levar à supressão de tumores (Figura)

Mais recentemente, a capacidade do p53 em regular o metabolismo celular da glicose e glutamina vem sendo estudados, mas ainda não foram bem compreendidos. Um dos eventos que acontece no processo de transformação celular e que também sofre controle do p53, é o aumento do consumo de glicose com produção de lactato, mesmo na presença de concentrações normais de oxigênio, também conhecido como efeito de Warburg (JIANG et al. 2013).

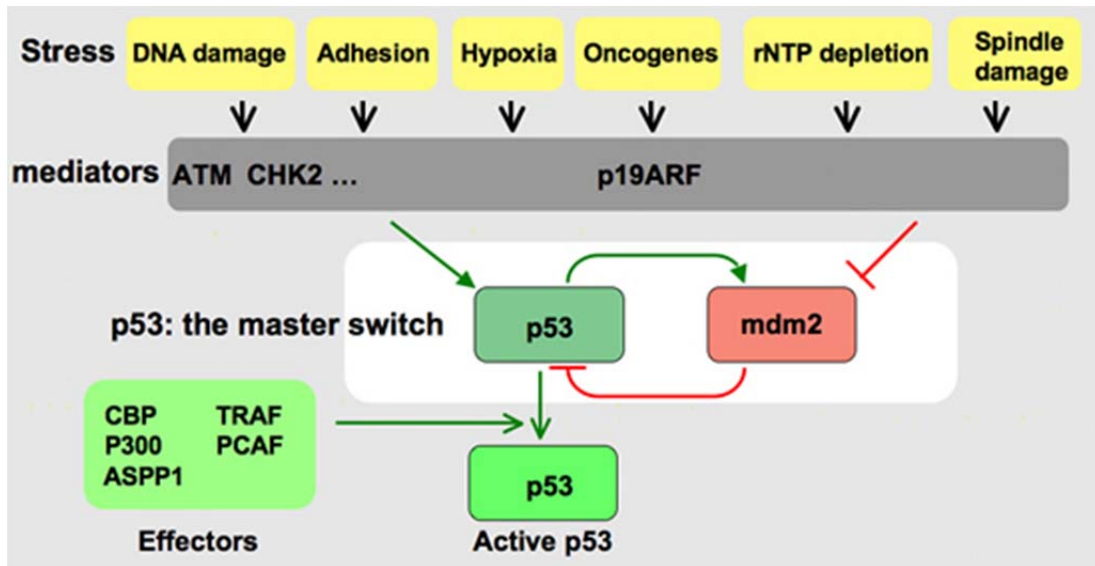
O primeiro estresse celular que foi demonstrado como modulador da atividade de p53 foi o dano ao DNA (MALTZMAN and CZYZYK 1984). Após a quebra da fita do DNA, ocorre ativação do p53 pela ATM proteína quinase. Essa ativação de p53 leva a transcrição de genes que desencadeiam a parada do ciclo celular, apoptose ou senescência (KASTAN et al. 1991). Dessa forma foi estabelecida uma via de ativação do p53 através de proteínas responsivas ao dano celular como ATM e CHK, que por sua vez culminava com a ativação de vários outros genes que previnem a instabilidade genômica e a tumorigênese, o que levou o p53 a ser denominado “Guardião do genoma” (LANE 1992).

Outros tipos de estresse celular levam a ativação do p53, como hipóxia, depleção de nutrientes, problemas na biogênese de ribossomos ou mitocôndrias, erros na gênese do fuso celular, choques térmicos, erros no arranjo tridimensional de proteínas ou ativação de oncogenes (MEEK et al. 2009).

A concentração intracelular de p53 é controlada por uma retroalimentação negativa exercida pela proteína regulatória MDM2, que é o maior regulador dos níveis e da atividade do p53 (MOMAND et al. 1992). MDM2 age bloqueando o domínio de transativação do p53 (Lin et al. 1994) e também agindo como uma ligase da ubiquitina, o que promove a degradação de p53 através da ubiquitinação (KUBBUTAT et al. 1997). A ativação ou mutação de vários oncogenes resulta na transcrição de ARF, que se liga a MDM2 e o inibe, o que, por sua vez leva a aumentos dos níveis e atividades do p53. A interferência na biogênese do ribossomo leva a produção de várias proteínas ribossomais em excesso que se ligam diretamente a MDM2, levando a sua inibição (PERRY 2010).

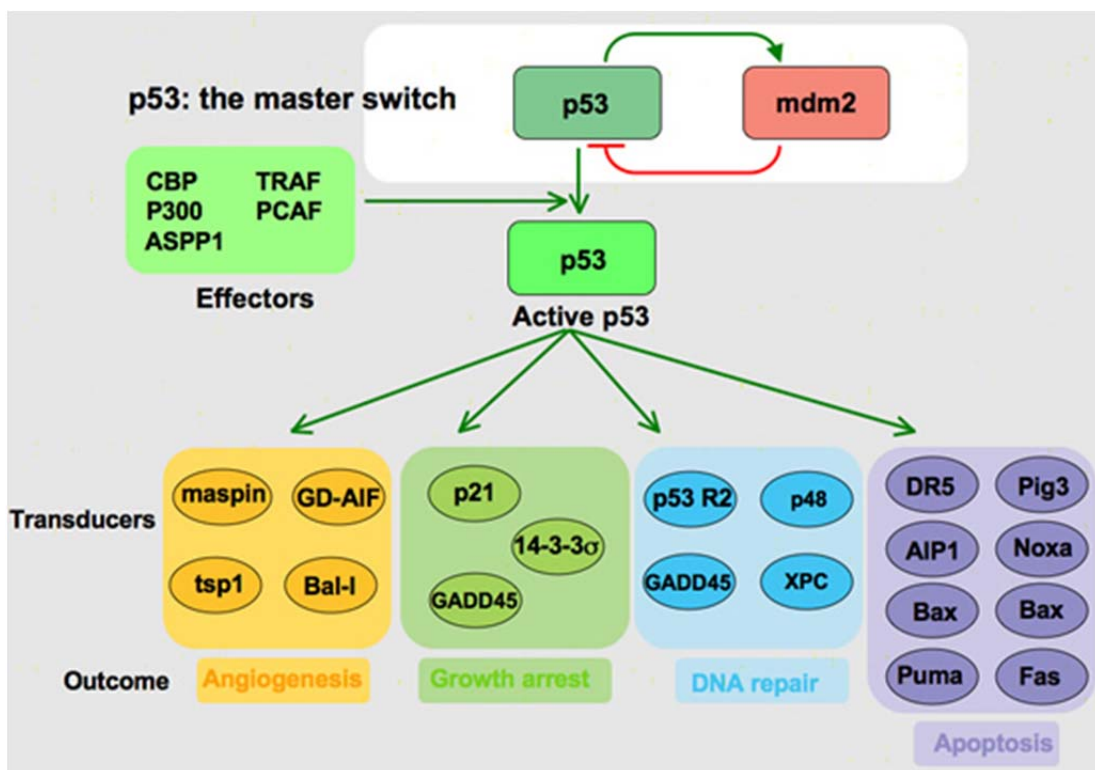
Essa complexidade de funções e interações do p53 selvagem e dos seus vários mutantes vem sendo extensamente estudada, tentando explorar possibilidades terapêuticas da interferência na expressão do p53 e das diversas proteínas que modulam a sua expressão. Isso pode ser possível através da transfecção de adenovírus recombinantes que restabelecem a expressão de p53 selvagem em células tumorais ou através por exemplo da inibição de MDM2 com várias drogas (VAZQUEZ et al. 2008).

Outro aspecto que vem sendo descrito é o controle exercido por p53 nos processos de reprogramação de células somáticas em células pluripotenciais, o que suscitou o surgimento da denominação “Guardião da reprogramação” (MENENDEZ et al. 2010; ALONI-GRINSTEIN et al. 2014).



Fonte: http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html

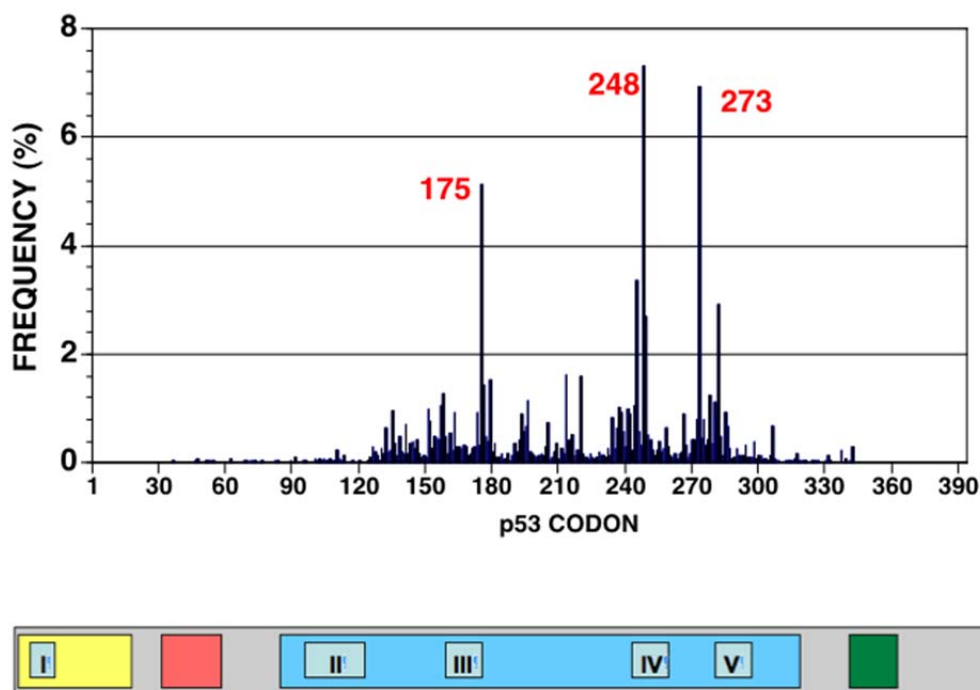
Figura 2 - Fatores que causam stress celular e proteínas efetoras que levam a ativação de p53.



Fonte: http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html

Figura 3 - Respostas ao stress celular moduladas por p53.

A proteína codificada pelo p53 existe em tetrâmeros, isto é, quatro cópias idênticas se juntam para constituir a forma ativa. Quando a célula tem um alelo normal de p53 e outro mutado, a função dessa proteína pode ficar prejudicada porque a maioria dos tetrâmeros terá pelo menos uma subunidade comprometida. As mutações no p53 ocorrem geralmente nos exons 5 a 8, entre os códons 130 e 290, em regiões denominadas *hot spots*, como mostra a Figura, sendo provável que a sua grande maioria (> 98%) represente mutações somáticas (LEVINE et al. 1991).



Fonte: http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html

Figura 3 - Localização dos códons que apresentam maior frequência de mutação (*hot spot*) do gene p53. As linhas verticais representam as frequências das mutações de cada sítio.

As técnicas de imunistoquímica podem ser utilizadas para a detecção do p53 e baseiam-se no fato de que mutações *missense* resultam em um aumento de 4 a 20 vezes da meia vida da proteína e acúmulo da mesma no núcleo (ESRIG et al. 1993).

Por outro lado, a ausência de imunorreatividade nuclear não afasta totalmente a presença de mutações no p53, pois mutações nonsense ou frameshift produzem proteínas truncadas que podem ser negativas pelo método. Além disso, os anticorpos usados não distinguem entre as formas selvagem e mutadas de p53 (FINLAY et al. 1988). A concordância entre a expressão imunoistoquímica do p53 e a presença de mutações missense é alta. Em um estudo analisando tumores de mama, a imunoistoquímica mostrou sensibilidade de 72% e especificidade de 92% quando comparada ao sequenciamento do cDNA na detecção de mutações do p53 (NORBERG et al. 1998).

Como exposto anteriormente, o p53 encontra-se mutado em um grande número de neoplasias. Um levantamento recente investigou amostras de 3281 tumores de 12 tipos diferentes e detectou mutação do p53 em 42% dos casos. Em carcinomas de ovário esse índice chegou a 95% e em carcinoma de endométrio a 89%. A mutação do p53 foi considerado um evento chave em tumores de mama, cabeça e pescoço e ovário. Em muitos tipos de tumor houve correlação entre mutação do p53 e piores indicadores, como estágio e sobrevida (KANDOTH et al. 2013).

A expressão imunoistoquímica do p53 tem sido avaliada nos mais diversos tipos de tumores e mostrou correlação com prognóstico. Em câncer de mama existem resultados conflitantes, ora mostrando que o aumento da expressão da proteína leva a um pior prognóstico (LEVESQUE et al. 1998), ora mostrando correlação com melhor prognóstico (GÖHRING et al. 1995).

Um trabalho recente analisou a imunoexpressão de p53, ki67 e PECAM-1 em 82 casos de carcinoma urotelial de pelve renal e encontrou correlação entre o

aumento da expressão de p53 com pior prognóstico, mas nenhuma associação com a expressão das outras proteínas (GARCÍA-TELLO et al. 2014).

Em carcinomas esofágicos, a importância da expressão imunoistoquímica do p53 permanece incerta. Um estudo em que a imunoposição do p53 foi analisado em 266 casos de carcinomas epidermóides de esôfago não mostrou correlação com o prognóstico (MURATA et al. 2013). Achados semelhantes foram relatados por outros autores (INADA et al. 1999; HASHIMOTO et al. 1999). No entanto, outro autor reportou sobrevida de 5 anos de 51% e 35,7% em pacientes com p53 negativo e p53 positivo, respectivamente ($p < 0,05$) (KOBAYASHI et al. 1999).

Em um trabalho desenvolvido nesta instituição, a imunoposição do p53 foi estudada no tumor primário de 82 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis. O acúmulo nuclear do p53 foi identificado em 41,5% das amostras. O aumento da expressão dessa proteína se correlacionou de forma independente com maior risco de metástases linfonodais nessa população (LOPES et al. 2002).

(GIL et al. 2002) estudou a expressão do p53 em 55 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis e encontrou correlação entre aumento da expressão do p53 e pior prognóstico, além de maior estágio clínico e patológico.

Uma revisão sistemática da literatura mostrou que a expressão do p53 em carcinoma epidermóide de pênis varia de 40% a 89% e não existe correlação definitiva com o grau ou estágio da doença. Os estudos que analisaram correlação da imunoposição do p53 com risco de metástases linfonodais mostraram correlação entre aumento da expressão do p53 e maior risco de metástases linfonodais, além de pior sobrevida em 5 e 10 anos (MUNEER et al. 2009).

Como citado anteriormente, a atividade do gene Tp53 sofre regulação pela nucleofosmina (GRISENDI et al. 2006; YUNG 2007). Esta interação ainda não foi estudada em carcinoma epidermóide de pênis.

2.9 Ki67

A proteína pKi67 foi inicialmente identificada em 1983 através de um de anticorpo monoclonal gerado pela imunização de camundongos com núcleos de células de linfoma de Hodgkin da linhagem L428. O nome foi derivado da cidade alemã de Kiel e do número 67, que correspondia à identificação do anticorpo no “96-Well plate”. O antígeno não foi inicialmente caracterizado e foi denominado antígeno Ki67. Podia ser identificado no núcleo de células em fase de proliferação, assim como nos centros germinativos de folículos corticais, timócitos corticais e espermatogônias indiferenciadas, mas não em células não proliferativas, como linfócitos, monócitos, células renais e células espermáticas maduras (GERDES et al. 1983).

Um trabalho subsequente analisou mais detalhadamente a expressão do antígeno Ki67 de acordo com as fases do ciclo celular e revelou que o anticorpo reagia com uma estrutura nuclear presente exclusivamente em células nas fases G1, S, G2 e na mitose, mas não em células em G0, tanto em células normais como tumorais (GERDES et al. 1984).

A expressão de Ki67 está fortemente relacionada às fases de proliferação celular, provavelmente mais do que qualquer outra proteína. Essa é uma

característica fundamental, apesar de suas funções no processo de proliferação não serem claras (SCHOLZEN et al. 2000).

No entanto, essa relação entre a expressão da proteína Ki67 e a fase de proliferação celular parece não ser tão absoluta assim. Sabemos que a pKi67 pode continuar hiperexpressa em células cujo ciclo celular foi bloqueado após sofrerem dano ao DNA, com conseqüente aumento da transcrição de p53 selvagem e p21. Alguns autores advertem para o uso da expressão de Ki67 quando p53 selvagem e p21 estiverem hiperexpressos (VAN OIJEN et al. 1998).

Nesse contexto, a expressão da proteína Ki67 parece expressar a capacidade da célula se dividir, desde que o bloqueio do ciclo celular seja removido. Além disso, temos que considerar que a expressão da proteína Ki67 representa apenas o estado da célula naquele momento, ou seja, se está proliferando ou não, mas não diz respeito obrigatoriamente à velocidade em que esse processo de proliferação acontece (SCHOLZEN et al. 2000).

De qualquer modo, mesmo antes de ser completamente caracterizado, o antígeno Ki67 foi utilizado para o diagnóstico e correlacionado com o prognóstico em várias neoplasias humanas, tais como melanoma, carcinomas de mama e linfomas (GERDES 1990).

Um dos problemas enfrentados inicialmente para a pesquisa da expressão da proteína Ki67 foi o fato de que o anticorpo original só funcionava adequadamente em tecido fresco ou congelado, mas não podia ser utilizado em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Esse problema foi contornado com a produção de um anticorpo equivalente, o MIB-1, que funcionava adequadamente em tecido

parafinado. Isso permitiu que seu uso se difundisse com a padronização de técnicas de imunistoquímica convencionais (CATTORETTI et al. 1992).

A estrutura completa da proteína foi descrita em 1993 após a clonagem e sequenciamento do cDNA. Duas isoformas da proteína foram originalmente descritas. Elas tem peso molecular calculado em 320 kD e 359 kD, geradas através de “splicing” alternativo de RNAm, transcrito a partir de um único gene. A proteína possui uma grande porção central, com 16 elementos repetitivos, condicionados por um único exon de 6845 pares de bases (SCHLÜTER et al. 1993). Posteriormente, o locus gênico completo da proteína Ki67 com 30000 pares de bases foi sequenciado e localizado no cromossomo 10q25 (DUCHROW et al. 1996).

A meia vida da proteína é de aproximadamente 60 a 90 minutos, o que explica a rápida diminuição da sua expressão após a divisão celular e início de um estado não proliferativo (HEIDEBRECHT et al. 1996).

Embora a estrutura molecular da proteína e o gene que a codifica tenham sido descritos há muito tempo, a sua função continua pouco compreendida. Uma das dificuldades para essa elucidação é que não conhecemos outras proteínas homólogas (SCHOLZEN et al. 2000).

Essa proteína sofre fosforilação e desfosforilação durante a mitose e sofre ação de proteases que regulam a sua expressão. A pKi67 se localiza no nucléolo, mas também é encontrada ao redor dos cromossomos durante a mitose. A meia-vida da proteína é de aproximadamente 60 a 90 minutos e é regulada provavelmente pelo sistema de síntese e degradação do proteassomo. Apesar da função dessa proteína não ser bem compreendida, sabemos que ela é fundamental para a proliferação, uma

vez que a remoção da pKi67 com nucleotídeos “antisense” impedem a proliferação celular (BROWN e GATTER 2002).

O valor da expressão do pKi67 vem sendo estudado em muitos tumores. Alguns trabalhos apontam seu valor prognóstico em vários tipos de tumores, como carcinomas de mama, pulmão, próstata, meningiomas. Outros não mostram tal correlação. (BROWN e GATTER 2002).

Em carcinomas esofágicos, uma revisão sistemática e metanálise recente da literatura não encontrou valor prognóstico na expressão do ki-67 (CHEN et al. 2013).

Nos pacientes portadores de metástases hepáticas de carcinoma colorretal, a expressão do Ki-67 foi apontada como um fator preditivo importante do prognóstico e pode ajudar na tomada de decisão sobre a ressecção dessas metástases (SPOLVERATO et al. 2013).

Em carcinomas superficiais de bexiga, a maior expressão da proteína Ki-67 e do p53 se associou a menor sobrevida livre de doença. (PICH et al. 2002)

Um estudo desenvolvido no nosso meio analisou a expressão do pKi67 pesquisado por “tissue microarray” (TMA) em tumores da cavidade oral. Os autores encontraram associação do aumento da expressão do pKi67 com presença de metástases linfonodais, estadios mais avançados da doença e pior prognóstico (COUTINHO-CAMILLO et al. 2010).

Em câncer de pênis, a expressão da pKi67 vem sendo estudada e a correlação com prognóstico tem sido contraditória. FARIA et al. (2000) avaliou a expressão do pKi67 por imunistoquímica em 26 pacientes e não encontrou correlação com metástases linfonodais nem com prognóstico (FARIA et al. 2000).

Um trabalho realizado nesta instituição encontrou associação entre o aumento da expressão imunistoquímica do pKi67 e uma menor chance de metástases linfonodais. A possível explicação para isso foi o padrão de crescimento exofítico encontrado na maioria dos tumores de pênis, ao invés do crescimento vertical, invasivo. Esses tumores de crescimento exofítico proliferam muito, mas tem pouca tendência a invadir os tecidos profundos e metastatizar, e o pKi67 estava expresso em grandes quantidades nesses tumores (GUIMARÃES et al. 2007).

3 OBJETIVOS

Estudar nesse grupo de pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis os seguintes aspectos:

Avaliar o impacto da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, do p53 e do Ki67 na sobrevida global e livre de doença.

Avaliar a associação entre a expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, do p53 e do Ki67 no risco de metástases linfonodais.

Avaliar a associação da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, do p53 e do Ki67 com fatores clínicos, epidemiológicos e anatomopatológicos já conhecidos.

4 CASUÍSTICA E METODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Critérios de Inclusão

Pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis, submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário e a linfadenectomia regional bilateral em qualquer momento do seu seguimento.

Pacientes submetidos a tratamento do tumor primário e não submetidos à linfadenectomia, mas que tenham seguimento adequado por pelo menos 3 anos.

Pacientes que tenham material arquivado suficiente para novos cortes histológicos.

4.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes não submetidos a linfadenectomias e com menos 3 anos de seguimento adequado para se assegurar a não existência de metástases linfonodais.

Pacientes que não tenham material disponível em parafina para a realização adequada de novos cortes para coloração imunoistoquímica e/ou confirmação diagnóstica.

Pacientes sem informações adequadas no prontuário.

Pacientes submetidos a radioterapia prévia ou tratamento adjuvante.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Dados Clínicos e Anatomopatológicos

Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários médicos do Serviço de Arquivo Médico e Estatística-SAME do Centro de Tratamento e Pesquisa - A.C.Camargo Cancer Center, Fundação Antônio Prudente de São Paulo. Esse é um estudo retrospectivo de uma amostra obtida por conveniência.

O período de recrutamento foi de 1954 a 2016. Foram selecionados inicialmente 206 casos e após aplicados os critérios de exclusão, restaram 112. Ao longo do estudo, muitos dos pacientes inicialmente selecionados foram excluídos por esgotamento do material arquivado em blocos de parafina, o que impediu a realização de novos cortes histológicos. Em boa parte dos casos isso decorreu do uso do material para muitos outros estudos realizados na instituição.

O material arquivado em parafina no Departamento de Anatomia Patológica foi revisado pelo Dr. Fernando Augusto Soares. Todos os casos foram reclassificados e reestadiados pelo sistema TNM, sétima edição 2009.

A classificação histológica foi realizada considerando os seguintes subtipos: carcinoma epidermóide (CEC) usual, basalóide, warty, verrucoso, papilar, sarcomatóide, carcinomas mistos, adenoescamoso, pseudo-hiperplásico, carcinoma cuniculatum, pseudoglandular, warty-basalóide, condiloma gigante (giant) e anaplásico (EPSTEIN et al. 2011; CHAUX et al. 2012).

As variáveis consideradas foram: idade, estado civil, raça, antecedentes venéreos; postectomia prévia; tempo de evolução da doença; estadiamento pelo TNM AJCC 7 edição (Tabela 1), grau de diferenciação tumoral; invasão vascular

microscópica (IVM); invasão perineural (IVP); padrão de microscópico de bordas tumorais ou frente de invasão – “pushing” ou “infiltrating”, descrito por ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989); espessura tumoral; invasão de corpo cavernoso e invasão de uretra. Adicionalmente, foram avaliados o tempo de seguimento; a evolução pós-operatória; surgimento de recidiva e seu tratamento; situação clínica ao final do estudo.

A partir do material existente nos blocos de parafina foram realizados novos cortes para análise de áreas representativas dos tumores primários e para a coloração imunoistoquímica da nucleofosmina, p53 e Ki67. A expressão desses marcadores foi associada com a sobrevida, com o risco de metástases linfonodais e com fatores clínicos e patológicos citados acima.

Essa pesquisa não representou risco para os pacientes do estudo, pois todos já foram tratados e nenhuma mudança na terapêutica foi adotada. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em 15/10/2010 e está matriculado sob o número 1478/10. Recebeu aprovação do referido Comitê em outubro de 2011.

4.2.2 Técnica de Imunoistoquímica

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, identificamos os blocos de parafina referentes à peça cirúrgica do tumor primário.

Foi realizada reação de imunoistoquímica automatizada para os anticorpos no equipamento Benchmark ULTRA (VENTANA). Utilizamos o protocolo sugerido pelo fabricante (VENTANA), que consistiu das seguintes etapas: 1- desparafinização em solução de EZ Prep; 2-aplicação de Coveslip (LCS) após lavagens e antes das aplicações dos reagentes subsequentes. 3- recuperação antigênica por calor (95°C)

em solução recuperante CC1 por 36 minutos; 4- lavagem com Reaction Buffer; 5- aplicação dos anticorpos por 28 minutos (Quadro 3); 6- detecção com o Kit ultraView Universal DAB 7- lavagens com Reaction buffer; 8- contracoloração com Hematoxilina por 12 minutos; 9- incubação com Bluing Reagent (pós-contrastante) por 4 minutos; 10-lavagem das lâminas em Reaction buffer, passagem em água corrente e montagem das lâminas.

Quadro 3 - Especificações dos anticorpos e diluições utilizadas nas reações de imunohistoquímica.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
NPM	NA24	200pg/ml	Thermo Scientific
anti-Ki-67 Confirm TM	(30-9)	2pg/ml	Ventana
P53	DO-7	0,5pg/ml	Ventana

Quanto à metodologia da análise da expressão das proteínas, a leitura foi realizada de forma automatizada quantitativa pelo Aperio® em lâmina convencional. A expressão nuclear de todos os marcadores foi classificada de modo qualitativo, considerando-se como positivas as células neoplásicas que apresentavam núcleos acastanhados, com variação de tonalidade. O número final de células reativas foi definido em porcentagem em relação ao universo de células contadas.

Até o momento da conclusão deste trabalho, não encontramos publicações sobre a expressão da nucleofosmina em câncer de pênis. Como veremos adiante, após testarmos os quartis dos valores encontrados para expressão da nucleofosmina, utilizamos como valor de corte para expressão baixa ou alta, o valor da mediana.

Para o p53, o valor de corte utilizado para diferenciar entre baixa e alta expressão foi de 10 %. Ou seja, as lâminas que apresentavam 10% ou mais de células coradas, eram considerados casos com alta expressão.

Em relação ao Ki-67, o valor de corte também foi de 10%.

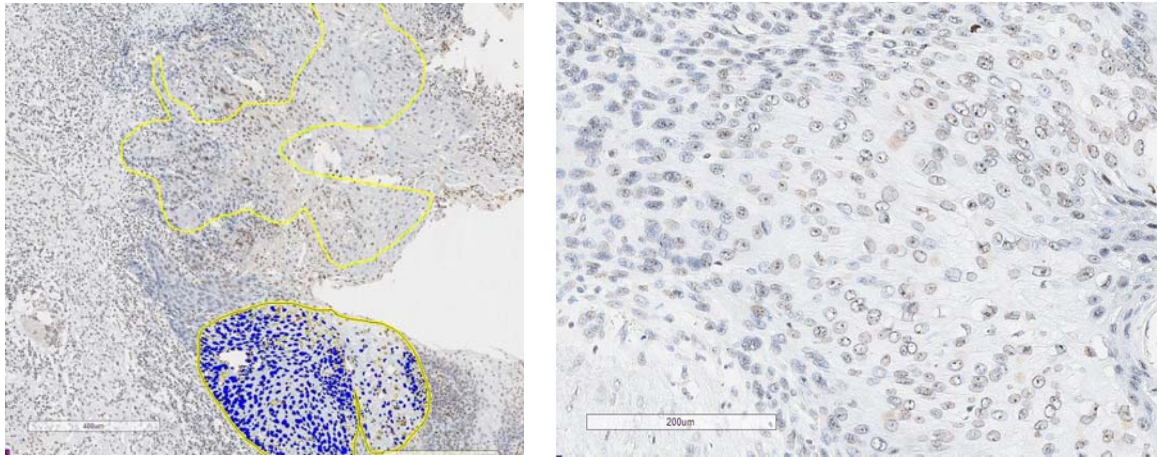


Figura 5 - Microfotografia demonstrando expressão nuclear da nucleofosmina em carcinoma epidermóide de pênis. À esquerda observamos tumor com alta expressão. Em amarelo, área delimitada para leitura. Em azul, células com baixa expressam a proteína. Na figura da direita observamos tumor com baixa expressão da proteína.

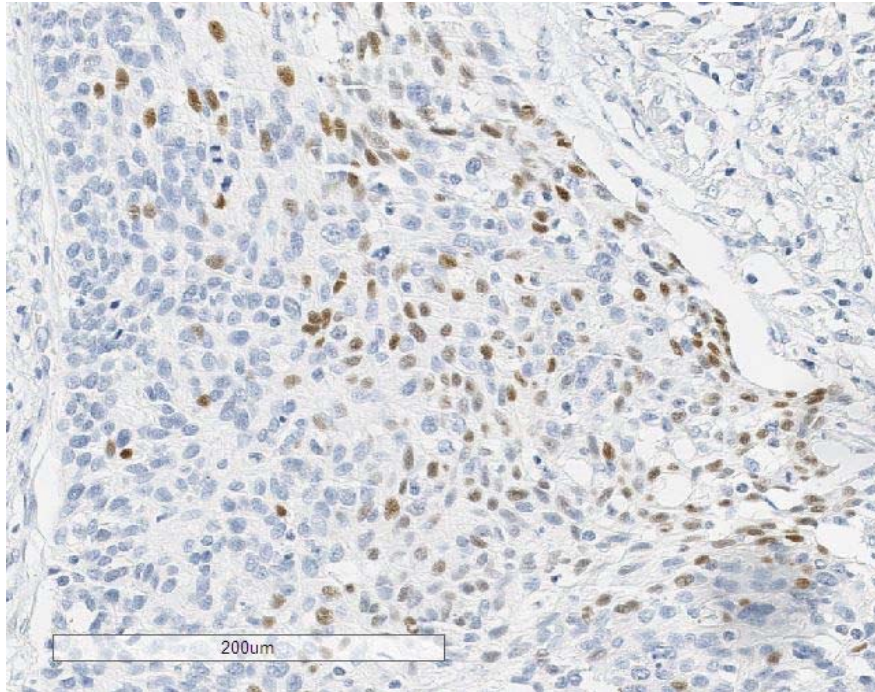


Figura 6 - Microfotografia demonstrando forte expressão nuclear de Ki67 em carcinoma epidermóide de pênis. Notar a cor castanha dos núcleos. Imunoistoquímica, Ki67.

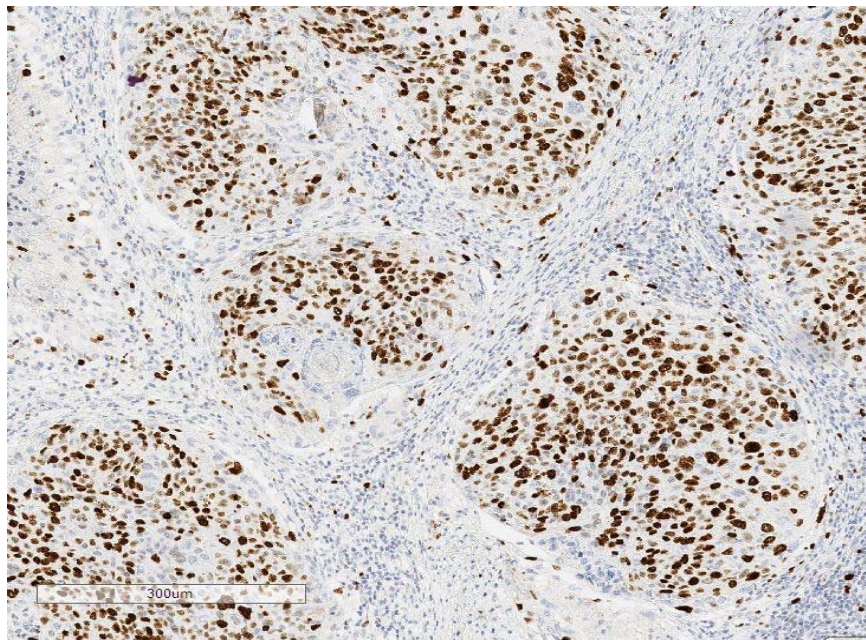


Figura 7 - Microfotografia demonstrando expressão nuclear de p53 em carcinoma epidermóide de pênis. Imunoistoquímica, p53.

4.2.3 Análise Estatística

Os dados obtidos dos prontuários foram registradas em uma ficha de levantamento padronizada (Apêndice 1). Esses dados foram arquivados em um banco de dados com o auxílio do programa “Microsoft Excel for Mac 2011”, versão 14.5.7. A análise estatística foi realizada com o programa “Statistical Package for Social Science” (SPSS) versão 21.0.

A distribuição das variáveis clínicas e anatomopatológicas foram apresentadas na forma de tabelas de contingências.

A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e respectivos desvios padrões. As associações das variáveis qualitativas com a presença de metástases linfonodais foram realizadas com o teste do qui-quadrado bicaudal; sempre que necessário, devido às frequências esperadas inferiores ao valor 5 dentro de tabelas maiores que 2x2, utilizamos o valor do qui-quadrado bi-caudal corrigido (Teste de Fisher). O nível de significância utilizado foi de 5% para todos os testes estatísticos.

A identificação dos fatores independentes relacionados com a ocorrência de metástases linfonodais foi realizada pela regressão logística múltipla. As variáveis selecionadas para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20.

As análises de sobrevida global e livre de doença foram feitas pelo estimador de KAPLAN e MEIER (1958) e a comparação entre as curvas de sobrevida através do teste de Log-rank. Na análise multivariada para sobrevida utilizamos o modelo de riscos proporcionais de COX (1972) para o cálculo das razões de risco proporcional para óbito. As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada

para sobrevida global, livre de doença e câncer específica foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20, respeitando a proporção de uma variável para cada dez eventos.

O tempo de sobrevida global foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data da última informação objetiva observada para os pacientes vivos nesta data, ou a data do óbito decorrente de qualquer causa. Os pacientes vivos na data da última informação foram considerados sob censura para a curva de sobrevida pelo método de KAPLAN e MEIER (1958) ou para utilização da regressão de COX (1972). Pacientes que não compareceram às consultas ou sem informações por um período superior a duas vezes o estipulado para o retorno foram considerados perdidos de vista na data da última informação. Esses pacientes contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

O resultado final para os modelos multivariados, regressão logística e de COX (1972), foi obtido pela estratégia “stepwise backward selection”, onde a partir da variável de maior significância na análise univariada foram acrescentadas as outras, uma a uma, em ordem crescente.

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas com eliminação de casas decimais.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

A idade dos pacientes variou de 21 a 87 anos, com média de 54,3 anos e desvio padrão de 13. Setenta e sete pacientes (68,8%) tinham idade menor ou igual a 60 anos, enquanto 35 (31,2%) tinham mais que 60 anos.

Oitenta pacientes (71,4%) eram brancos e 22 (19,7%) eram não brancos. Em 10 pacientes (8,9%) esse dado era ignorado.

Em relação ao estado civil, 81 eram casados (72,3%) e 29 (29,5%) eram não casados (solteiros, separados ou viúvos). Em dois pacientes (1,8%) não havia essa informação. Antecedente de doença venérea foi referido por 29 pacientes (25,8%), enquanto que 63 (56,3%) negavam. Não havia informação em 20 (17,9%).

A principal queixa referida por 48 pacientes (42,9%) foi apenas a presença de ferida no pênis. Outros 46 (41,0 %) referiam ferida associada a dor, inflamação ou prurido. Quarenta e três pacientes (38,4%) tinham antecedente de fimose. Setenta e sete (74%) dos pacientes não haviam sido submetidos a postectomia. Vinte e um (20,2%) foram submetidos a postectomia já quando apresentavam sintomas do câncer de pênis contra apenas 6 (5,8%) que foram submetidos ao procedimento antes de qualquer manifestação da moléstia.

O tempo de evolução da doença desde o aparecimento dos primeiros sintomas até o diagnóstico variou de 1 a 240 meses, com média 19,52 meses (dp= 35,44) e mediana de 6,5 meses. Setenta e sete pacientes (68,8%) tinham até 12 meses de

evolução ao diagnóstico, enquanto que 27 (24,1%) tinham mais de 12 meses. Esse dado era ignorado em 8 pacientes (7,1 %). Apenas 2 pacientes (1,8%) apresentavam metástases a distância.

O seguimento variou de zero a 378 meses, com média de 79,1 meses e desvio padrão de 79,6 meses.

Tabela 1 - Frequência das variáveis clínicas e epidemiológicas em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis

Variável	Categoria	N	%
Idade	até 60 anos	77	68,8
	> 60 anos	35	31,2
Estado civil	Casados	81	72,3
	Não casados	29	25,9
	Ignorados	2	1,8
Raça	Branca	80	71,4
	Não branca	22	19,7
	Ignorados	10	8,9
Tempo de evolução	até 12 meses	77	68,8
	> 12 meses	27	24,1
	Ignorados	8	7,1
Antecedente venéreo	Não	63	56,3
	Sim	29	25,8
	Ignorados	20	17,9
Estadiamento cT	T1	14	12,5
	T2	46	41,1
	T3	43	38,4
	T4	2	1,8
	Ignorados	7	6,2
Estadiamento cN	N0	33	29,5
	N1	19	17
	N2	47	42
	N3	4	3,5
	Ignorados	9	8,0
Estadiamento M	M0	97	86,6
	M1	2	1,8
	Ignorados	13	11,6
Cirurgia Realizada	Amputação parcial	69	61,6
	Amputação total	33	29,4
	Emasculação	5	4,5
	Exérese local	2	1,8
	Postectomia	2	1,8
	Ignorados	1	0,9
Recidiva	Nao	76	67,9
	Sim	34	30,4
	Ignorado	2	1,7

5.2 ASPECTOS CIRÚRGICOS

Em relação ao tipo de cirurgia realizada para o tratamento do tumor primário, 69 pacientes (61,6%) foram submetidos a amputação parcial, enquanto que 33 (29,4%) foram submetidos a amputação total. Cinco pacientes (4,5%) foram submetidos a emasculação e quatro (3,6%) foram submetidos a ressecção local ou postectomia. Noventa e um pacientes (81,3%) não apresentaram complicações relacionadas à amputação, enquanto que 19 (16,9%) apresentaram complicações. A mais frequente delas foi a estenose do neomeato, que ocorreu em 11 pacientes (9,8%). Apenas três pacientes (2,8%) apresentaram recidiva no sítio da amputação.

Quanto ao tratamento dos linfonodos regionais, 75 (67,0%) pacientes foram submetidos a linfadenectomias, enquanto 37 (33,0%) foram poupados deste procedimento. Estes últimos foram classificados como não sendo portadores de metástases linfonodais após três anos de seguimento sem evidência de linfonodos comprometidos (SORIA et al. 1997; PIZZOCARO et al. 2010). Entre os 75 pacientes operados, vinte e sete (36,0%) foram submetidos a linfadenectomias inguinais, quarenta e um (54,6%) foram submetidos a linfadenectomias inguinoilíacas e em três (4,0%) o tipo de linfadenectomia não foi especificado. Nesse mesmo grupo de pacientes operados, vinte e sete (36,0%) foram submetidos a linfadenectomias de princípio e 44 (54,6%) foram submetidos a linfadenectomias de necessidade.

Quanto à presença de linfonodos metastáticos, cinquenta e oito (51,8%) pacientes não apresentaram metástases linfonodais e 54 (48,2%) apresentaram metástases linfonodais. Apenas 2 (1,7%) pacientes apresentaram metástases ilíacas de forma isolada, sem comprometimento simultâneo de linfonodos inguinais. Dentre

os 54 que tinham metástases linfonodais 23 (42,5%) tinham linfonodos comprometidos bilateralmente.

No que se refere a complicações relacionadas às linfadenectomias, dos 75 pacientes operados, 72 tinham informações confiáveis no prontuário sobre complicações. Destes 28 pacientes (38,8%) não apresentaram complicações contra 44 (61,2%) que apresentaram alguma complicação. Entre os 44 pacientes que apresentaram alguma morbidade relacionada às linfadenectomias, trinta e oito (86,4%) apresentaram infecção, necrose e/ou deiscência dos retalhos dermogordurosos da região inguinal como complicação isolada ou em alguma combinação entre elas.

5.3 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DO TUMOR PRIMÁRIO

Na Tabela 2 podemos observar a frequência das principais características anatomopatológicas do tumor primário na casuística do presente trabalho.

Tabela 2 - Frequência das variáveis anatomopatológicas do tumor primário em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.

Variável	Categoria	N	(%)
Grau de diferenciação	Grau I	14	12,5
	Grau II e III	98	87,5
Invasão vascular	Negativo	79	70,5
	Positivo	30	26,8
	Ignorado	3	2,7
Invasão perineural	Negativo	61	54,5
	Positivo	48	42,9
	Ignorado	3	2,6
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	49	43,8
	Positivo	50	44,6
	Ignorado	13	11,6
Infiltração de uretra	Negativo	60	53,6
	Positivo	38	33,9
	Ignorado	14	12,5
Bordas tumorais	Pushing	25	22,3
	Infiltrating	84	75
	Ignorado	3	2,7
Espessura tumoral	até 5 mm	27	24,1
	>5 mm	70	62,5
	Ignorado	15	13,4

*Excluídos casos sem informação

5.4 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA NUCLEOFOSMINA, KI67 E P53 E ASSOCIAÇÃO COM FATORES CLÍNICOS, E PATOLÓGICOS

Na Tabela 3 temos a expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53 segundo padronizamos no presente trabalho.

Tabela 3 - Expressão imunoistoquímica da Nucleofosmina, Ki67 e p53 no tumor primário

Proteína	Categoria	N	%
Nucleofosmina*	Baixa (< 4,31)	54	50,00
	Alta (> 4,31)	54	50,00
Ki67*	Baixa (< 10%)	12	10,90
	Alta (>10%)	98	89,10
p53*	Baixa (<10%)	64	57,70
	Alta (>10%)	47	42,30

A baixa expressão imunoistoquímica da nucleofosmina se associou de modo significativo a tumores de maior estadiamento clínico T ($p < 0,001$) e maior estadiamento clínico N ($p = 0,010$). Não houve associação estatisticamente significativa com outras variáveis clínicas ou epidemiológicas da população desse estudo, dados que podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Associação da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina com variáveis clínicas e epidemiológicas

Variável	Categoria	Nucleofosmina baixa expressão N %	Nucleofosmina alta expressão N %	p(x2)
Idade	até 60 anos	40 (74,1)	35 (64,8)	0,296
	>60 anos	14 (25,9)	19 (35,2)	
Estado Civil*	Casado	34 (65,4)	43 (79,6)	0,100
	Não casado	18 (34,6)	11 (20,4)	
Raça*	Não branco	13 (24,5)	8 (17,8)	0,417
	Branco	40 (75,5)	37 (82,2)	
Tempo de evolução*	Até 12 meses	43 (79,6)	31 (67,4)	0,164
	>12 meses	11 (20,4)	15 (32,6)	
Antecedente Venéreo*	Não	34 (69,4)	28 (71,8)	0,806
	Sim	15 (30,6)	11 (28,2)	
Estadiamento cT*	T1-T2	21 (40,4)	39 (79,6)	< 0,001
	T3-T4	31 (59,6)	10 (20,4)	
Estadiamento cN*	N negativo	10 (32,3)	21 (67,7)	0,010
	N positivo	41 (60,3)	27 (39,7)	
Recidiva*	Não	39 (53,4)	34 (46,6)	0,447
	Sim	15 (45,5)	18 (54,5)	

* Excluídos casos sem informação

A baixa expressão da nucleofosmina se associou significativamente com a invasão de corpos cavernosos ($p < 0,001$), mas não com outras características patológicas do tumor primário, como podemos ver pela Tabela 5.

Tabela 5 - Associação da expressão imunoistoquímica da nucleofosmina com variáveis patológicas

Variável	Categoria	Nucleofosmina baixa expressão N %	Nucleofosmina alta expressão N %	p(X2)
Grau de diferenciação	Grau I	7 (53,8)	6 (46,2)	0,767
	Grau II e III	47(49,5)	48 (50,5)	
Invasão vascular*	Negativo	34 (65,4)	42 (79,2)	0,112
	Positivo	18 (34,6)	11 (20,8)	
Invasão perineural*	Negativo	30 (50,7)	27 (50,9)	0,488
	Positivo	22 (42,3)	26 (49,1)	
Infiltração de corpos cavernosos*	Negativo	15 (31,3)	33 (68,8)	<0,001
	Positivo	33 (68,8)	15 (31,3)	
Infiltração da uretra*	Negativo	26 (57,8)	33 (66,0)	0,409
	Positivo	19 (42,2)	17 (34,0)	
Bordas tumorais*	Pushing	9 (17,3)	14 (26,4)	0,259
	Infiltrating	43 (82,7)	39 (73,6)	
Espessura tumoral*	até 5 mm	11 (22,4)	15 (34,1)	0,212
	> 5 mm	38 (77,6)	29 (65,9)	

*Excluídos casos sem informação

Houve associação estatisticamente significativa entre o aumento da expressão imunoistoquímica do p53 e a maior ocorrência de recidivas ($p=0,005$). Outras variáveis clínicas e epidemiológicas da população estudadas não mostraram associação significativa com a expressão do p53, dados expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Associação da expressão imunoistoquímica do p53 com variáveis clínicas e epidemiológicas

Variável	Categoria	p53 Baixa expressão N %	p53 Alta expressão N %	p (x2)
Idade	até 60 anos	48 (75,0)	28 (59,6)	0,084
	>60 anos	16 (25,0)	19 (40,4)	
Estado Civil*	Casado	44 (55,0)	36 (45,0)	0,510
	Não casado	18 (61,2)	11 (37,9)	
Raça*	Não branco	16 (25,0)	6 (16,2)	0,303
	Branco	48 (75,0)	31 (83,8)	
Tempo de evolução*	Até 12 meses	48 (63,2)	28 (36,8)	0,486
	>12 meses	15 (55,6)	12 (44,4)	
Antecedente Venéreo*	Não	38 (66,7)	25 (73,5)	0,493
	Sim	19 (33,3)	9 (26,5)	
Estadiamento cT*	T1-T2	34 (56,7)	26 (43,3)	0,341
	T3-T4	29 (65,9)	15 (34,1)	
Estadiamento cN*	N negativo	21 (63,3)	12 (36,4)	0,788
	N positivo	42 (60,9)	27 (39,1)	
Recidiva*	Não	50 (66,7)	25 (33,3)	0,005
	Sim	13 (38,2)	21 (61,8)	

*Excluídos casos sem informação

A expressão imunoistoquímica do p53 não se associou de modo significativo com nenhuma variável patológica do tumor primário nessa casuística (Tabela 7)

Tabela 7 - Associação da expressão imunoistoquímica do p53 com variáveis patológicas

Variável	Categoria	P53 baixa expressão N %	P53 alta expressão N %	p(X2)
Grau de diferenciação	Grau I	7 (50,0)	7 (50,0)	0,535
	Grau II e III	57 (58,8)	40 (41,2)	
Invasão vascular*	Negativo	45 (72,6)	33 (71,7)	0,923
	Positivo	17 (27,4)	13 (28,3)	
Invasão perineural*	Negativo	39 (62,9)	21 (45,7)	0,074
	Positivo	23 (37,1)	25 (54,3)	
Infiltração de corpos cavernosos*	Negativo	28 (50,9)	20 (46,3)	0,666
	positivo	27 (49,1)	23 (53,5)	
Infiltração da uretra*	Negativo	36 (65,5)	23 (54,8)	0,285
	Positivo	19 (34,5)	19 (45,2)	
Bordas tumorais*	Pushing	15 (24,6)	9 (19,1)	0,500
	Infiltrating	46 (75,4)	38 (80,9)	
Espessura tumoral*	até 5 mm	18 (29,5)	8 (22,9)	0,480
	> 5 mm	43 (70,5)	27 (77,1)	

*Excluídos casos sem informação

Não observamos associação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica do Ki67 com características clínicas ou epidemiológicas dessa população estudada, tampouco com características anatomopatológicas do tumor primário. Esses dados podem ser observados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 - Associação da expressão imunoistoquímica do Ki67 com variáveis clínicas e epidemiológicas

Variável	Categoria	Ki67 baixa expressão N %	Ki67 alta expressão N %	p (x2)
Idade	até 60 anos	9 (75,0)	67 (68,4)	0,639
	>60 anos	3 (25,0)	31 (31,6)	
Estado Civil	Casado	8 (10,1)	71 (89,9)	0,591
	Não casado	4 (13,8)	25 (86,2)	
Raça*	Não branco	2 (16,7)	20 (22,7)	0,634
	Branco	10 (83,3)	68 (77,3)	
Tempo de evolução*	Até 12 meses	7 (58,3)	68 (75,6)	0,204
	>12 meses	5 (41,7)	22 (24,4)	
Antecedente Venéreo*	Não	6 (66,7)	56 (69,1)	0,879
	Sim	3 (33,3)	25 (30,9)	
Estadiamento cT*	T1-T2	8 (66,7)	52 (57,1)	0,529
	T3-T4	4 (33,3)	39 (42,9)	
Estadiamento cN*	N negativo	3 (9,4)	29 (90,6)	0,596
	N positivo	9 (13,0)	60 (87,0)	
Recidiva*	Não	9 (11,8)	67 (88,2)	0,710
	Sim	3 (9,4)	29 (90,6)	

*Excluídos casos sem informação

Tabela 9 - Associação da expressão imunoistoquímica do Ki67 com variáveis patológicas

Variável	Categoria	Ki67 baixa expressão N %	Ki67 alta expressão N %	p(X2)
Grau de diferenciação	Grau I	3 (21,4)	11 (78,6)	0,177
	Grau II e III	9 (9,4)	87 (90,6)	
Invasão vascular*	Negativo	8 (66,6)	70 (73,7)	0,606
	Positivo	4 (33,3)	25 (26,3)	
Invasão perineural*	Negativo	9 (75,0)	51 (53,7)	0,161
	Positivo	3 (25,0)	44 (46,3)	
Infiltração de corpos cavernosos*	Negativo	5 (50,0)	44 (50,0)	>0,999
	positivo	5 (50,0)	44 (50,0)	
Infiltração da uretra*	Negativo	7 (77,8)	53 (60,2)	0,302
	Positivo	2 (22,2)	35 (39,8)	
Bordas tumorais*	Pushing	1 (8,3)	24 (25,3)	0,192
	Infiltrating	11 (91,7)	71 (74,7)	
Espessura tumoral*	Até 5 mm	2 (16,7)	24 (28,9)	0,374
	> 5 mm	10 (83,3)	59 (71,1)	

*Excluídos casos sem informação

5.5 ANÁLISE DO RISCO DE METÁSTASES LINFONODAIS

Dentre as variáveis clínicas avaliadas, a única que se associou significativamente com a ocorrência de metástases linfonodais foi o estadiamento clínico cN ($p=0,001$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Associação entre variáveis clínicas e demográficas com a presença de metástases linfonodais

Variável	Categoria	Linfonodo negativo		Linfonodo positivo		p(x2)
		N	%	N.	%	
Idade	Até 60 anos	38	(49,4)	39	(50,6)	0,444
	>60 anos	20	(57,1)	15	(42,9)	
Estado Civil*	Não-casado	10	(34,5)	19	(65,5)	0,059
	Casado	46	(56,8)	35	(43,2)	
Raça*	Não Branco	15	(68,2)	7	(31,8)	0,106
	Branco	39	(48,8)	41	(51,3)	
Tempo de evolução*	Até 12 meses	41	(53,2)	36	(46,8)	0,901
	>12 meses	14	(51,9)	13	(48,1)	
Antecedente Venereo*	Não	34	(54,0)	29	(46,0)	0,841
	Sim	15	(51,7)	14	(48,3)	
Estadiamento cT*	T1 + T2	36	(60,0)	24	(40,0)	0,071
	T3 + T4	19	(42,2)	26	(57,8)	
Estadiamento cN*	cN0	25	(75,8)	8	(24,2)	0,001**
	cN+	28	(40,0)	42	(60,0)	

*Excluídos casos sem informação

Na Tabela 11 podemos observar que as seguintes variáveis influenciaram de modo significativo a ocorrência de metástases linfonodais: o grau de diferenciação ($p=0,007$), a invasão vascular ($p=0,004$), a invasão perineural ($p<0,001$), a infiltração

de corpos cavernosos ($p=0,004$), a infiltração da uretra ($p=0,013$) e a espessura tumoral ($p=0,008$). A expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, do Ki67 e do p53 não exerceu influência estatisticamente significativa sobre a ocorrência de metástases linfonodais.

Tabela 11 - Associação entre variáveis patológicas e imunoistoquímicas e a presença de metástases linfonodais

Variável	Categoria	Linfonodos Negativos N %	Linfonodos positivos N %	p(X2)
Grau de diferenciação	Grau I	12 (85,7)	2 (14,3)	0,007**
	Grau II e III	46 (46,9)	52 (53,1)	
Invasão vascular*	Negativo	48 (60,8)	31 (39,2)	0,004**
	Positivo	9 (30,0)	21(70,0)	
Invasão perineural*	Negativo	41 (67,2)	20 (32,8)	<0,001**
	Positivo	16 (33,3)	32(66,7)	
Infiltração de corpos cavernosos*	Negativo	32 (65,3)	17 (34,7)	0,004**
	positivo	18 (36,0)	32 (64,0)	
Infiltração da uretra*	Negativo	36 (60,0)	24 (40,0)	0,013**
	Positivo	13 (34,2)	25 (65,8)	
Bordas tumorais*	Pushing	13 (52,0)	12 (48,0)	0,943
	Infiltrating	43 (51,2)	41 (48,8)	
Espessura tumoral*	até 5 mm	20 (74,1)	7 (25,9)	0,008**
	> 5mm	31 (44,3)	39 (55,7)	
Nucleofosmina *	baixa	26 (48,2)	28 (51,8)	0,564
	alta	29 (53,8)	25 (46,2)	
p53*	baixa	37 (57,8)	27 (42,2)	0,112
	alta	20 (42,5)	27 (57,4)	
Ki67 *	baixa	7 (58,4)	5 (41,6)	0,680
	alta	51 (52,0)	47 (48,0)	

* Excluídos os casos sem informação

Procedemos também a análise multivariada para o risco de metástases linfonodais. Foram selecionadas variáveis com p até 0,20, observando também a proporção de uma variável para cada 10 eventos ocorridos nessa casuística. As variáveis selecionadas podem ser vistas na Tabela 12.

Tabela 12 - Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para risco de metástases linfonodais.

Variável	p (x2)
Invasão perineural	<0,001
Estadio cN	0,001
Infiltração de corpos cavernosos	0,004
Invasão vascular	0,004
Espessura tumoral	0,008
Infiltração da uretra	0,013
Grau	0,020

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o estadiamento clínico N (RR=5,5); IC [1,4-20,8], a infiltração de corpos cavernosos (RR=3,9); IC [1,2-12,3] e a invasão perineural (RR=4,9); IC [1,5-16,2] foram fatores independentes de risco para o comprometimento metastático dos linfonodos (Tabela 13).

Tabela 13 - Risco de metástases linfonodais pela análise multivariada

Variável	Categoria	RR	IC 95%	
Estadiamento cN	cN0	1	Ref.	
	cN+	5,5	1,5	20,8
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	1	Ref.	
	Positivo	3,9	1,2	12,3
Invasão perineural	Negativo	1	Ref.	
	Positivo	4,9	1,5	16,2

5.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

A situação clínica ao final do seguimento dos 112 pacientes dessa casuística pode ser observada na Tabela 14.

Tabela 14 - Situação clínica dos 112 pacientes ao final do seguimento.

Situação clínica	N	%
Vivo sem doença	44	39,2
Vivo com doença	7	6,3
Óbito por câncer	24	21,4
Óbito por outra causa	35	31,3
Perdido de vista	2	1,8

A sobrevida global para o grupo ao final de 120 meses foi de 47,3%. Dentre as variáveis clínicas, aquelas que influenciaram significativamente a sobrevida global foram a raça ($p=0,009$) e a ocorrência de recidivas ($p=0,018$) (Tabela 15).

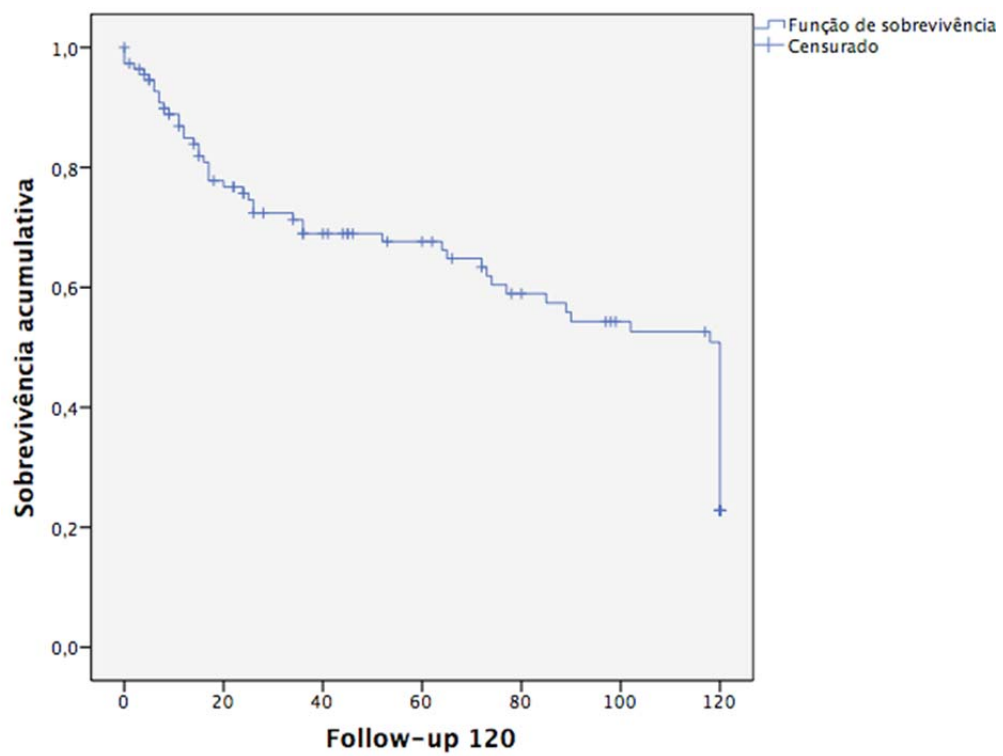


Figura 8 - Curva de sobrevida global para 112 pacientes portadores de carcinoma peniano

Tabela 15 - Probabilidade acumulada de sobrevida global aos 10 anos de acordo com variáveis clínicas

Variável	Categoria	n	Sobrevida em 10 anos	p (log rank)
Idade	Até 60 anos	77	0,584	0,133
	>60 anos	35	0,339	
Raça*	Branco	80	0,874	0,009**
	Não Branco	22	0,463	
Estado civil*	Não-casado	29	0,232	0,190
	Casado	81	0,550	
Tempo de evolução*	Até 12 meses	77	0,511	0,425
	>12 meses	27	0,511	
Antecedentes Venereos*	Não	63	0,542	0,502
	Sim	29	0,420	
Estadiamento cT*	T1 + T2	60	0,531	0,597
	T3 + T4	45	0,518	
estadiamento cN*	cN0	33	0,544	0,524
	cN+	70	0,506	
Recidiva*	Não	76	0,586	0,018**
	Sim	34	0,336	

*Excluídos casos sem informação

Podemos observar na Tabela 16 a influência das variáveis patológicas e imunoistoquímicas do tumor primário na sobrevida global. As que influenciaram significativamente a sobrevida global em 10 anos foram grau moderado e alto ($p=0,031$), a presença de infiltração de corpos cavernosos ($p=0,037$), a presença de invasão vascular ($p=0,02$), a presença de invasão perineural ($p=0,030$), a espessura tumoral maior que 5 mm ($p=0,015$) e a ocorrência de metástases linfonodais ($p=0,003$). A expressão imunoistoquímicas da nucleofosmina, do Ki67 e do p53 não influenciou a sobrevida global em 10 anos. (Figuras 9, 10 e 11).

Tabela 16 - Probabilidade acumulada de sobrevida global aos 10 anos de acordo com variáveis patológicas e gradação imunoistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53

Variável	Categoria	N	Sobrevida 10 anos	p(log rank)
Grau	Baixo grau	14	1,000	0,031**
	Moderado e alto	98	0,441	
Infiltração de corpo cavernoso*	Negativo	49	0,613	0,037
	Positivo	50	0,401	
Infiltração de uretra*	Negativo	60	0,556	0,449
	Positivo	38	0,458	
Invasão vascular*	Negativo	79	0,627	0,002**
	Positivo	30	0,104	
Invasão perineural*	Negativo	61	0,597	0,030**
	Positivo	48	0,422	
Espessura tumoral*	≤ 5	27	0,794	0,015
	> 5	70	0,410	
Bordas*	Pushing	25	0,625	0,612
	Infiltrating	84	0,489	
Metástases linfonodais	Negativo	58	0,658	0,003**
	Positivo	54	0,258	
Nucleofosmina*	baixa	54	0,430	0,142
	alta	54	0,632	
Ki67*	baixa	12	0,366	0,368
	alta	98	0,510	
p53*	baixa	64	0,578	0,122
	alta	47	0,392	

*Excluídos casos sem informação

As seguintes variáveis foram selecionadas para compor o modelo multivariado da sobrevida global nessa casuística, observando aquela com p até 0,20 e a proporção de 1 variável para cada 10 eventos (Tabela 17).

Tabela 17 - Lista de variáveis selecionadas para análise multivariada da sobrevida global por ordem de entrada

Variável	p (log rank)
Invasão vascular	0,002
Metástases linfonodais	0,003
Raça	0,009
Recidiva	0,018
Invasão perineural	0,030
Grau	0,031

Após análise multivariada, apenas a presença de invasão vascular (RR=1,9; IC [1,0-3,6]) esteve associada significativamente a menor sobrevida global (Tabela 18).

Tabela 18 - Risco de óbito em pacientes portadores de carcinoma peniano de acordo com modelo multivariado por variáveis selecionadas

Variável	Categoria	RR	IC 95%	
Invasão vascular	Negativo	1	Ref.	
	Positivo	1,9	1,0	3,6

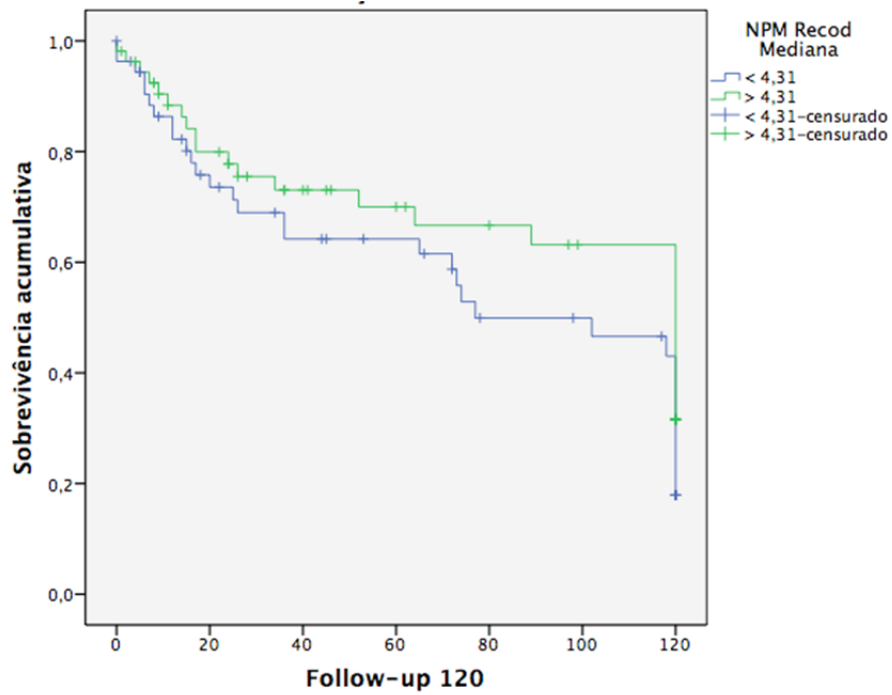


Figura 9 - Curva de sobrevida global segundo a expressão imunoistoquímica da nucleofosmina em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis

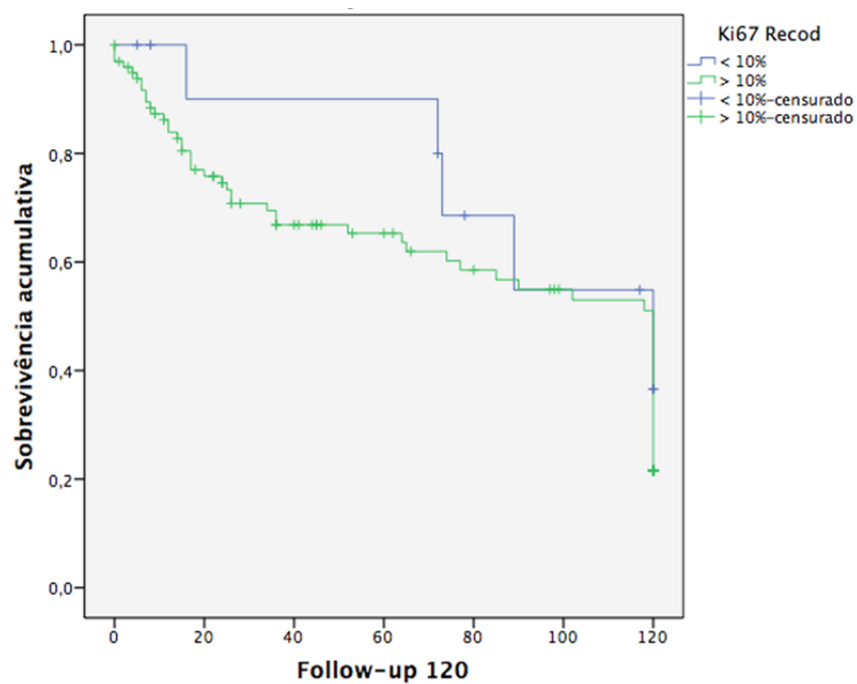


Figura 10 - Curva de sobrevida global segundo a expressão imunoistoquímica do Ki67 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis

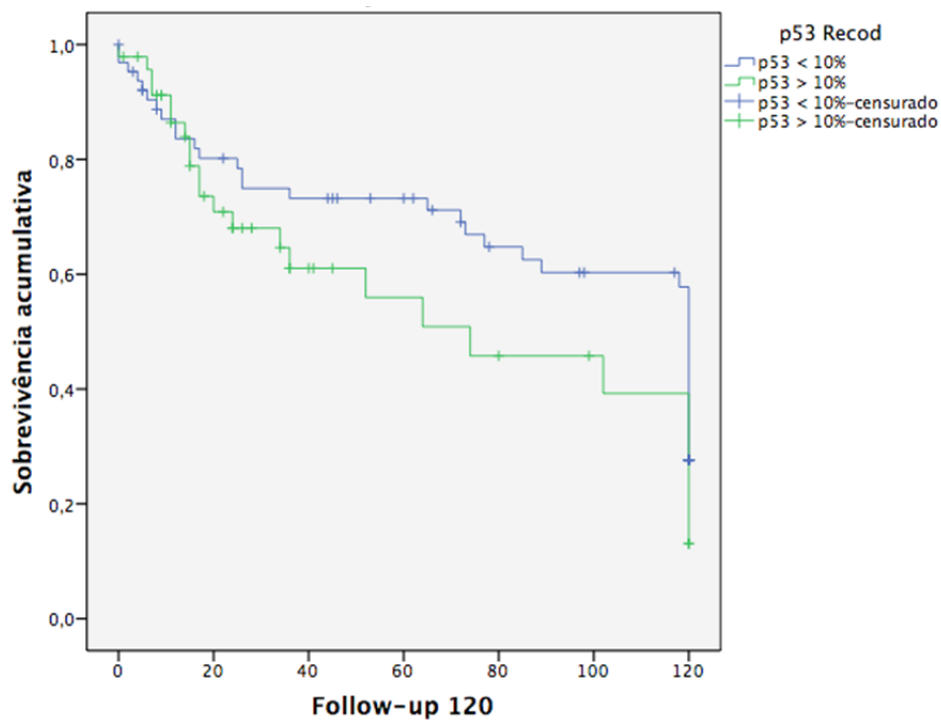


Figura 11 - Curva de sobrevida global segundo a expressão imunoistoquímica do p53 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis

5.7 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA.

Dentre as variáveis clínicas, nenhuma influenciou significativamente a sobrevida livre de doença (Tabela 19).

Tabela 19 - Sobrevida livre de doença em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis de acordo com variáveis clínicas

Variável	Categoria	n	Sobrevida em 10 anos	p (log rank)
Idade	Até 60 anos	77	0,662	0,077
	>60 anos	35	0,857	
Raça*	Branco	80	0,700	0,210
	Não Branco	22	0,864	
Estado civil*	Não-casado	29	0,232	0,190
	Casado	81	0,550	
Tempo de evolução*	Até 12 meses	77	0,688	0,077
	>12 meses	27	0,852	
Antecedentes Venereos*	Não	63	0,698	0,212
	Sim	29	0,828	
Estadiamento cT*	T1 + T2	60	0,817	0,065
	T3 + T4	45	0,644	
estadiamento cN*	cN0	33	0,788	0,322
	cN+	70	0,714	

*Excluídos casos sem informação

Podemos observar na Tabela 20 a influência das variáveis patológicas e imunoistoquímicas do tumor primário na sobrevida livre de doença. As que apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a sobrevida livre de doença foram a presença da infiltração de corpo cavernoso ($p < 0,001$), a ocorrência de infiltração da uretra ($p = 0,032$), a presença de infiltração vascular ($p < 0,001$), a presença de metástases linfonodais ($p < 0,001$) e a ocorrência de alta expressão imunoistoquímica do p53 ($p = 0,008$). (Figura 14).

Tabela 20 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença de acordo com variáveis patológicas e expressão imunohistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53

Variável	Categoria	N	Sobrevida 10 anos	p(log rank)
Grau	Baixo grau	14	0,857	0,181
	Moderado e alto	98	0,704	
Infiltração de corpo cavernoso*	Negativo	49	0,878	<0,001**
	Positivo	50	0,540	
Infiltração de uretra*	Negativo	60	0,783	0,032**
	Positivo	38	0,579	
Invasão vascular*	Negativo	79	0,823	<0,001**
	Positivo	30	0,500	
Invasão perineural*	Negativo	61	0,770	0,125
	Positivo	48	0,688	
Espessura tumoral*	≤ 5	27	0,852	0,196
	> 5	70	0,743	
Bordas*	Pushing	25	0,760	0,572
	Infiltrating	84	0,714	
Metástases linfonodais	Negativo	58	0,897	<0,001**
	Positivo	54	0,537	
Nucleofosmina*	baixa	54	0,667	0,210
	alta	54	0,778	
Ki67*	baixa	12	0,833	0,380
	alta	98	0,724	
p53*	baixa	64	0,813	0,008**
	alta	47	0,596	

*Excluídos casos sem informação

** Variáveis selecionadas para a análise multivariada

Na Tabela 21 encontramos as variáveis selecionadas para compor o modelo multivariado de análise da sobrevida livre de doença. Foram selecionadas aquelas com p até 0,20 e a proporção de 1 variável para cada 10 eventos.

Tabela 21 - Lista das variáveis de acordo com a ordem de entrada para análise multivariada de sobrevida livre de doença.

Variável	p (log rank)
Metástases linfonodais	<0,001
Invasão Vascular	<0,001
Infiltração de corpo cavernoso	<0,001
p53	0,008
infiltração de uretra	0,032

Após a análise multivariada apenas a invasão de corpo cavernoso (RR=4,0; IC [1,4-11,3]) e a ocorrência de metástases linfonodais (RR=4,2;IC[1,4-13,1]) estiveram associadas significativamente a menor sobrevida livre de doença (Tabela 22).

Tabela 22 - Risco de recidiva dos pacientes de acordo com o modelo multivariado por variáveis selecionadas

Variável	Categoria	RR	IC 95%	
Invasão corpo cavernoso	Negativo	1	Ref.	
	Positivo	4,0	1,4	11,3
Metástases linfonodais	ausente	1	Ref	
	presente	4,2	1,4	13,1

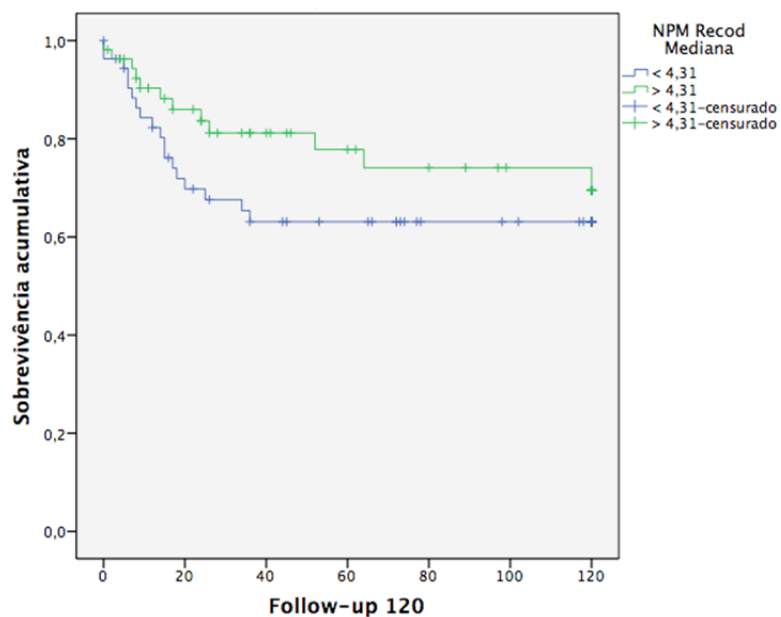


Figura 12 - Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão imunohistoquímica da nucleofosmina em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.

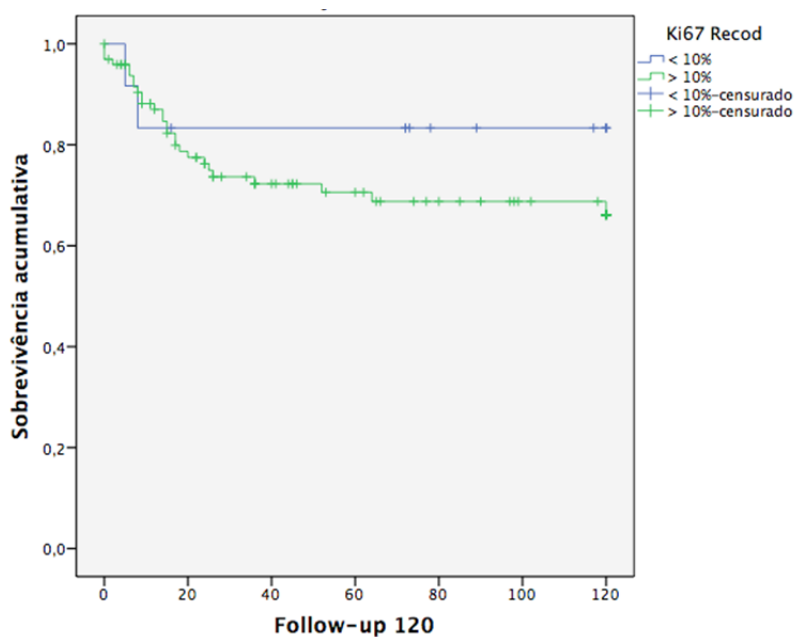


Figura 13 - Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão imunohistoquímica do Ki67 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis

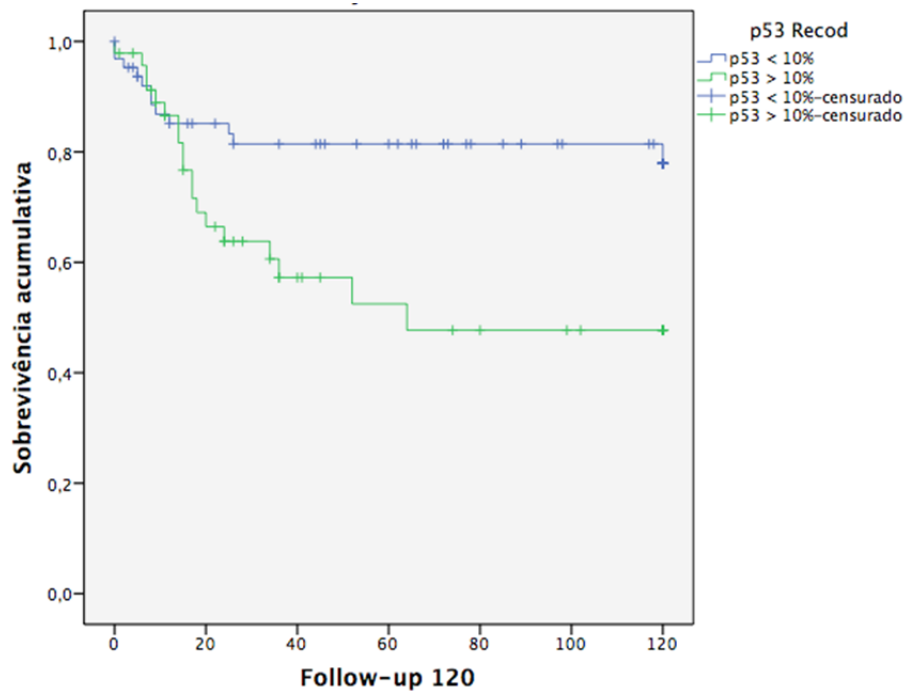


Figura 14 - Curva de sobrevida livre de doença segundo a expressão imunohistoquímica do p53 em 112 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS GERAIS

Neste trabalho de pesquisa tivemos a oportunidade de avaliar 112 casos de carcinoma epidermóide do pênis, todos tratados numa única instituição. Esse é um número que não se consegue facilmente num único centro. As informações estão disponíveis em prontuários arquivados em um serviço de arquivo médico e estatístico bem organizado, o que facilita o acesso aos dados. Boa parte da dificuldade se concentra em conseguir o retorno adequado de pacientes predominantemente de baixa renda, muitos dos quais sem endereço fixo. Apesar disso, ao final do seguimento, tivemos apenas dois pacientes (1,8%) perdidos de vista.

Trata-se de uma análise retrospectiva de uma amostra obtida por conveniência, com dados de prontuários e análises de peças anatômicas arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica. Os sujeitos da pesquisa não foram expostos a risco, pois todos já foram tratados de acordo com os protocolos da instituição. No entanto, o longo período de observação implica também mudanças de conduta ao longo das décadas. O primeiro paciente dessa série foi tratado ainda na década de cinquenta, assim como muitos outros até a década de noventa, quando os protocolos de tratamento foram bem estruturados. Isso implica em mudanças no que diz respeito a técnica cirúrgica, acesso ao sistema de saúde, a antibióticos e outros itens que podem ter implicação por exemplo nos índices de complicação e recidiva.

Dificuldades como as que expus só poderão ser contornadas quando tivermos muitos hospitais especializados em tratamento de câncer, bem estruturados, abertos a essa população de baixa renda, afeitos à pesquisa de boa qualidade e capazes de conduzir estudos prospectivos com material anatomopatológico a fresco.

Boa parte da pesquisa de ponta hoje é voltada aos cânceres de próstata, rim e bexiga, patologias mais incidentes em países desenvolvidos. Poucos trabalhos tem explorado fatores moleculares relacionados ao câncer de pênis. Até o momento da conclusão deste trabalho não encontramos nenhuma menção à expressão da nucleofosmina em câncer de pênis. Poucos se voltaram para proteínas como p53 e Ki67. Isso reforça a importância desse trabalho mesmo diante de eventuais ressalvas.

6.2- ASPECTOS CLÍNICOS E ETIOPATOLÓGICOS

Na presente casuística podemos observar pacientes com média de idade de 54,3 anos, variando de 21 a 87 anos. Apesar da incidência predominar entre homens de 50 a 70 anos de idade, um estudo organizado pela Sociedade Brasileira de Urologia mostrou que 3,5% dos pacientes tinham menos de 26 anos e cerca de 16% tinham de 27 a 45 anos de idade (FAVORITO et al. 2008). Isso mostra a importância da investigação de qualquer lesão peniana suspeita, independente da idade. Além disso, os fatores de risco para o surgimento da doença, como condições sanitárias precárias, fimose, processos inflamatórios crônicos e tabagismo provavelmente estão presentes muito cedo nessa população.

Cerca de 83% dos pacientes referiam a presença de ferida isoladamente ou associada a dor, inflamação e prurido. Setenta e sete (74%) dos pacientes não haviam

sido submetidos a postectomia. Este fato se repete nas diversas casuísticas (LOPES et al. 1996a ; POW-SANG et al. 2002; MICALI et al. 2004).

Apenas 2 pacientes (1,8%) apresentaram metástases a distância, o que condiz com a frequência de 1 a 10% reportada pela literatura. É curioso o fato de um tumor originário de um órgão tão vascularizado gerar poucas metástases à distância (LOPES et al. 1996a e b; LEIJTE et al. 2008; ORNELLAS et al. 2008a e b).

Vinte e sete (24,1%) pacientes tinham mais de doze meses de evolução desde os primeiros sintomas até o diagnóstico firmado por biópsia. Isso se deve possivelmente a dificuldade de acesso ao sistema de saúde, falta de informação, vergonha e medo por parte dos pacientes. Também pode refletir baixo índice de suspeição por parte de profissionais que os examinaram anteriormente (LOPES et al. 1996a ; POW-SANG et al. 2002; FAVORITO et al. 2008).

6.3 ASPECTOS CIRÚRGICOS

Sessenta e nove pacientes (61,6%) foram submetidos a amputação parcial e 33 (29,4%) foram submetidos a amputação total. Isso reflete o fato de que 89 pacientes (79,5%) apresentavam estadiamento clínico T2 e T3. O tratamento do tumor primário se associou a cerca de 17 % de complicações, sendo a mais frequente a estenose do neomeato uretral, que ocorreu em 11 pacientes (9,8%). A recidiva no coto ocorreu em apenas 3 pacientes (2,8%). Índices de complicações semelhantes são relatados em outras séries (LEIJTE et al. 2008; GUIMARÃES et al. 2011, HAKENBERG et al. 2015). Isso nos mostra que o tratamento do tumor primário, apesar da mutilação, é acompanhado de poucas complicações.

Setenta e cinco pacientes (67,0%) foram submetidos a linfadenectomias. Os trinta e sete (33,0%) que foram poupados do procedimento, eram pacientes clinicamente N0 ou que tinham pequenos linfonodos palpáveis. Por algum motivo não foram operados e após três anos de seguimento não apresentaram doença linfonodal comprovada. Este tempo de observação é considerado como satisfatório para excluir a ocorrência de metástases linfonodais, o que nos deixa seguros para incluí-los na análise (SORIA et al. 1997; PIZZOCARO et al. 2010). Alguns motivos podem ser apontados para explicar porque alguns pacientes portadores de linfonodos palpáveis não foram submetidos a linfadenectomia inguinal. O primeiro deles é a demora de alguns pacientes em retornar ao serviço. Alguns voltavam após longo período e os linfonodos não haviam mudado de aspecto. Dessa forma eram poupados. Outra explicação é que a conduta não era completamente padronizada antes da década de noventa e o que era feito passava em grande parte pelo tirocínio do responsável pelo caso.

O índice de complicações relacionados às linfadenectomias foi de 61,2%. Índices que variam de 30% a 90% são reportados por vários autores (LOPES et al. 1996a , ORNELLAS 2008 b; BEVAN-THOMAS et al. 2002). O controle adequado da infecção muitas vezes presente no tumor primário e o uso de incisões paralelas aos ligamentos inguinais foram condutas adotadas no serviço com o intuito de reduzir esses índices de complicações. Mais recentemente, as linfadenectomias videoendoscópicas propostas por TOBIAS-MACHADO et al. (2006) vem sendo utilizadas com resultados iniciais satisfatórios, especialmente no que diz respeito às complicações relacionadas à incisão.

Quando indicadas, as linfadenectomias devem ser bilaterais, já que cerca de 30% dos pacientes apresenta acometimento de ambas as regiões inguinais (EKSTROM e EDSMYR 1958; LOPES et al. 1996a e b). Na nossa casuística, dos 54 pacientes portadores de metástases linfonodais 23 (42,5%) apresentava comprometimento bilateral, o que reforça essa idéia. Uma das possíveis explicações para um índice mais alto encontrado na nossa casuística é o fato de esse material ter sido revisado mais de uma vez, em várias pesquisas realizadas na instituição. Isso pode ter aumentado o índice de detecção de comprometimento linfonodal.

6.4 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA NUCLEOFOSMINA, KI67 E P53 E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

É inegável o fato de que a técnica de imunoistoquímica é passível de falhas. Períodos prolongados desde a obtenção do espécime cirúrgico, condições de armazenamento do material, uso de formol tamponado, escolha da área mais representativa do tumor, aspectos variados da técnica desde a desparafinização e espessura do corte, qualidade dos anticorpos e técnicas usadas na leitura das lâminas são todas etapas sujeitas a erros (ZEQUI 2000; YAZIJI e BARRY 2006; FRITSCHY 2008) Como dissemos anteriormente, os primeiros pacientes dessa série foram tratados ainda na década de cinquenta e o longo período de armazenamento pode influenciar na detecção dos antígenos pesquisados. O formol tamponado foi adotado em nosso serviço em 1997 e outros trabalhos aqui desenvolvidos mostraram maior detecção dos antígenos em peças fixadas com formol tamponado (ZEQUI 2000).

No entanto, destacamos que as reações imunoistoquímicas para detecção das proteínas seguiram protocolos padronizados pelo fabricante do equipamento de leitura automatizada (Ventana), adotados pelo Laboratório de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. A leitura das lâminas, apesar de automatizada, contou com a participação de patologista experiente, o Professor Doutor Fernando Augusto Soares, que selecionou as áreas mais representativas do tumor. Isso é fundamental para estabelecer os parâmetros de leitura da máquina e obter resultados confiáveis. Todas as etapas do processo seguiram rígidos padrões de controle de qualidade e foram realizadas por técnicos bastante experimentados.

O critério de corte para classificação da expressão da nucleofosmina não se encontra descrita na literatura. Portanto, testamos vários níveis de corte e decidimos por adotar a mediana após observar algumas associações.

No caso do Ki67, o nível de corte utilizado foi de 10%, como já utilizado anteriormente na instituição (GUIMARÃES et al. 2007).

No caso do p53, utilizamos também 10% como nível de corte após análise preliminar do banco de dados mostrar menor sobrevida livre de doença usando esse parâmetro. Outro trabalho realizado na instituição utilizou 20% como parâmetro de corte (LOPES et al. 2002). Alguns fatores podem explicar essas diferenças: uma população diferente, já que não se tratavam dos mesmos casos e um metodologia de leitura das lâminas também diversa. No nosso caso a leitura foi automatizada, no trabalho anterior a leitura foi manual.

Um resultado interessante é que a baixa expressão da nucleofosmina apresentou associação estatisticamente significativa com maior estadiamento clínico T ($p < 0,001$), com maior estadiamento N ($p = 0,010$) e com a infiltração de corpos

cavernosos ($p < 0,001$). Como mencionamos anteriormente, não encontramos na literatura consultada nenhuma referência sobre nucleofosmina e câncer de pênis, o que torna essa descrição inédita. Essas associações em conjunto nos permitem supor que a nucleofosmina se comporta como gene supressor de tumor em câncer de pênis. Comportamento semelhante foi descrito em câncer gástrico (LEAL et al. 2014). A literatura é controversa a respeito da função do gene que condiciona a proteína. Há trabalhos que o descrevem tanto como oncogene quanto como gene supressor de tumor (GRISENDI et al. 2006; LIM e WANG 2006; OKUWAKI 2008). Outros trabalhos, especialmente com técnicas de sequenciamento e material do banco de tumores são necessários afim de melhor avaliar essa hipótese.

O aumento da expressão imunohistoquímica do p53 se associou com a maior ocorrência de recidiva nessa população estudada ($p = 0,005$), o que tem implicação prognóstica, como pudemos observar nas análises de sobrevida livre de doença (Tabela 20). Não houve associação com outras variáveis clínicas ou patológicas, achados também relatado em trabalho realizado nesta instituição (LOPES et al. 2002).

A expressão imunohistoquímica do Ki67 não se associou significativamente com características clínicas ou patológicas do tumor primário, fato também relatado por GUIMARÃES et al. em 2007.

6.5 ANÁLISE DO RISCO DE METÁSTASES LINFONODAIS

Dentre os fatores clínicos, apenas o estadiamento clínico N ($p=0,001$) se associou significativamente com o risco de metástases linfonodais, fato também descrito em trabalhos anteriores (LOPES et al. 2002; CAMPOS et al. 2006). Apesar de ser evidente a correlação de um exame físico alterado e a ocorrência de comprometimento metastático dos linfonodos, esses achados corroboram a importância de um exame clínico minucioso da região inguinal. Sabemos, no entanto, que a acurácia do exame físico deixa a desejar (BEGGS e SPRATT 1964; CATALONA 1988).

As características patológicas do tumor primário que se associaram de forma estatisticamente significativa com a ocorrência de metástases linfonodais foram o grau de diferenciação ($p=0,007$), a invasão vascular ($p=0,004$), a invasão perineural ($p<0,001$), a infiltração de corpos cavernosos ($p=0,004$), a infiltração da uretra ($p=0,013$) e a espessura tumoral ($p=0,008$). O grau de diferenciação se mostrou importante na predição de metástases linfonodais em vários trabalhos (LOPES et al. 1996a, ORNELLAS et al. 2008a). A invasão linfovascular por células tumorais é bem reconhecida como fator de risco para metástases linfonodais (LOPES et al. 1996a, NOVARA et al. 2007; ORNELLAS et al. 2008b). Tal parâmetro tem sido utilizado para diferenciar os estádios pT1a e pT1b no sistema de estadiamento atualmente utilizado TNM, sétima edição (EDGE et al. 2009). A infiltração perineural foi descrita em uma grandes séries de casos como fator preditivo de metastatização linfonodal (CUBILLA et al. 2007; ORNELLAS et al. 2008a) e foi incorporada como fator de risco no consenso da Sociedade Européia de Urologia

(HAKENBERG et al. 2015). De forma semelhante, o estadió do tumor primário se correlaciona com o risco de metástases linfonodais (SOLSONA et al. 1992, ORNELLAS et al. 2008a). A espessura tumoral maior que 5 mm também se mostrou característica de valor para predição de metástases linfonodais, assim como reportado por outros autores (LOPES et al. 1996a; ORNELLAS et al. 2008)

A expressão imunoistoquímica da nucleofosmina, Ki67 e p53 não mostrou associação significativa com a ocorrência de metástases linfonodais.

Como mencionamos anteriormente, não encontramos referência na literatura sobre nucleofosmina e câncer de pênis, o que torna essa descrição inédita. Em outros tumores, os resultados são muitas vezes conflitantes.

Quanto ao p53, outro trabalho realizado nessa instituição mostrou associação entre maior expressão de p53 e metástases linfonodais (LOPES et al. 2002). Diferenças metodológicas na leitura das lâminas, a nossa automatizada e a outra manual, além de se tratar de uma população diferente, podem explicar tais achados. Outro trabalho que abordou o tema não abordou especificamente a ocorrência de metástases linfonodais, mas somente a análise de sobrevida (GIL et al. 2002).

Em relação ao Ki67, GUIMARÃES et al. (2007) descreveram uma associação entre baixa expressão de Ki67 e maior risco de metástases linfonodais, tendência que se manteve após análise multivariada. Os autores argumentaram que o grande número de casos na sua série de tumores pouco agressivos, mas que cresciam muito para a periferia sem invadir a profundidade do órgão, poderia explicar esse achado pouco usual. Outro trabalho realizado em nosso meio não mostrou associação entre expressão do Ki67 e agressividade da doença (FARIA et al. 2000).

Após a análise multivariada, as seguintes variáveis permaneceram como fatores independentes para o risco de metástases linfonodais nesta amostra: o estadiamento clínico N (RR=5,5); IC [1,4-20,8], a infiltração de corpos cavernosos (RR=3,9); IC [1,2-12,3] e a invasão perineural (RR=4,9); IC [1,5-16,2]. Isso reforça a importância dos fatores clínicos e patológicos já demonstrados em vários trabalhos citados anteriormente.

6.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL.

A taxa de 1,8% de pacientes perdidos de vista permitiu uma análise de sobrevida confiável nos pacientes estudados. A sobrevida global ao final de 10 anos foi de 47,3%. Considerando o estadiamento avançado de boa parte dos pacientes e a presença de metástases linfonodais em cerca de metade deles, essa taxa de sobrevida reforça a idéia de que o câncer de pênis é passível de cura mesmo quando apresenta metástases para os linfonodos.

Entre os fatores clínicos, os que influenciaram a sobrevida foram a raça ($p=0,009$) e a ocorrência de recidivas ($p=0,018$). É possível supor que a influência da raça sobre a sobrevida decorra da estrutura desigual da nossa sociedade, em que indivíduos não brancos costumam ter piores condições socioeconômicas e também maior dificuldade de acesso aos sistemas de saúde. A ocorrência de recidivas, muitas delas linfonodais, sabidamente empioram o prognóstico (LOPES et al. 1996a; ORNELLAS et al. 2008 a e b; LEIJTE et al. 2008).

As variáveis patológicas que influenciaram a sobrevida global foram grau moderado e alto ($p=0,031$), a presença de infiltração de corpos cavernosos ($p=0,037$),

a presença de invasão vascular ($p=0,02$), a presença de invasão perineural ($p=0,030$), a espessura tumoral maior que 5 mm ($p=0,015$) e a ocorrência de metástases linfonodais ($p=0,003$). Todos são fatores prognósticos citados por outros autores (LOPES et al. 1996a; NOVARA et al. 2007; ORNELLAS et al. 2008a; HAKENBERG et al. 2015).

Quanto ao p53, não encontramos associação da expressão imunoistoquímica e sobrevida global. Como vimos, outros autores relataram que o aumento da expressão do p53 se associou com pior sobrevida (LOPES et al. 2002; GIL et al. 2002). Isso provavelmente decorre do fato de se tratarem de casuísticas diferentes e de metodologias de confecção e leitura das lâminas. Além disso, a sobrevida global é influenciada por uma série de fatores, já que inclui vários pacientes que foram a óbito por outros motivos que não a doença em foco. É confiável do ponto de vista de conseguirmos identificar o evento, no caso o óbito por qualquer causa, mas sofre o viés de incluir eventos não relacionados ao câncer.

A expressão do Ki67 também não influenciou a sobrevida global, fato também constatado por GUIMARÃES et al. (2007). O fato de um tumor apresentar grande proliferação não obrigatoriamente o torna hábil em invadir e metastatizar, eventos estes que em última análise costumam levar ao óbito.

A imunoexpressão da nucleofosmina não exerceu influência na taxa de sobrevida global desta população. Como dito anteriormente, não há na literatura referência sobre câncer de pênis e essa proteína. Em tumores da cavidade oral o aumento da expressão da nucleofosmina avaliada por TMA se correlacionou com pior sobrevida (COUTINHO-CAMILLO et al. 2010). Achado semelhante foi relatado em uma série de pacientes com câncer de ovário (LONDERO et al. 2014).

Após análise multivariada, apenas a presença de invasão vascular (RR=1,9; IC [1,0-3,6]) esteve associada significativamente a menor sobrevida global. Esse achado reforça a importância dessa característica do tumor primário e já foi descrita em várias outras séries (LOPES et al. 1996a; NOVARA et al. 2007; ORNELLAS et al. 2008b). Esse fator é tão importante que foi proposta a sua incorporação ao sistema de estadiamento (LOPES et al. 1996a), o que veio a ocorrer na sétima edição do TNM (EDGE et al. 2009).

6.7 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

As variáveis que apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a sobrevida livre de doença foram a presença da infiltração de corpo cavernoso ($p < 0,001$), a ocorrência de infiltração da uretra ($p = 0,032$), a presença de infiltração vascular ($p < 0,001$), a presença de metástases linfonodais ($p < 0,001$) e a ocorrência de alta expressão imunohistoquímica do p53 ($p = 0,008$).

Como já descrevemos anteriormente, as associações de estadiamento, infiltração vascular e a ocorrência de metástases linfonodais estão bem documentadas como fatores prognósticos em câncer de pênis. (LOPES et al. 1996a; NOVARA et al. 2007; LEIJTE et al. 2008; ORNELLAS et al. 2008a; HAKENBERG et al. 2015). A presença de metástases linfonodais é considerada o principal fator prognóstico em câncer de pênis. Foi fator independente para risco de recidiva e óbito pela doença, assim como a infiltração de corpos cavernosos pela doença. Essas duas características são fundamentais para o estadiamento e correta conduta terapêutica.

Nesta avaliação o aumento da expressão do p53 se associou a pior sobrevida livre de doença. Podemos observar que quando analisamos apenas eventos diretamente relacionados à doença como recidiva e morte pelo câncer, essa associação se tornou significativa. Essa variável foi selecionada para compor o modelo multivariado e foi descartada apenas no último passo, com $p=0,052$. Talvez uma amostragem com maior número de casos e com maior ocorrência de recidiva ou óbito por câncer pudesse revelar associação significativa após análise multivariada.

A imunexpressão da nucleofosmina não mostrou associação com sobrevida livre de doença. Como exposto anteriormente, não dispomos de referência na literatura em câncer de pênis. Em outros tumores os achados são por vezes contraditórios. Além disso alguns trabalhos utilizam outras técnicas que não imunistoquímica (LONDERO et al. 2014).

A expressão imunistoquímica do Ki67 também não se associou significativamente com a sobrevida livre de doença, fato também observado em outro trabalho desenvolvido nesta instituição (GUIMARÃES et al. 2007). Tal ausência de influência também foi observada por FARIA et al. (2000). Como dissemos anteriormente, o fato de apresentar muita proliferação não implica necessariamente em grande número de metástases, progressão da doença e óbito.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitem concluir que:

1. A baixa expressão da nucleofosmina se associou a maiores estadios clínicos T e N e a invasão de corpos cavernosos.
2. O aumento da expressão imunohistoquímica do p53 se associou a pior sobrevida livre de doença na análise univariada. Essa associação não se manteve no modelo multivariado, que apontou para invasão de corpo cavernoso e presença de metástases linfonodais como fatores independentes para o risco de recidiva e óbito pela doença. A expressão da nucleofosmina e do Ki67 não influenciaram a sobrevida livre de doença.
3. A expressão da nucleofosmina, do p53 e do Ki67 não influenciaram a sobrevida global. No modelo multivariado apenas a invasão vascular se mostrou fator independente para o risco de óbito.
4. A expressão da nucleofosmina, do p53 e do Ki67 não influenciaram o risco de metástases linfonodais. A análise multivariada mostrou o estadiamento clínico N, a infiltração de corpos cavernosos e a invasão perineural como fatores independentes para o risco de metástases linfonodais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Aad AS, deKernion JB. Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. **Urol Clin North Am** 1992; 19:319-24.

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.

Aita GA, Zequi SC, Costa WH, Guimarães GC, Soares FA, Giuliangelis TS. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. **Int Braz J Urol** 2016; 42:1136-43.

Aloni-Grinstein R, Shetzer Y, Kaufman T, Rotter V. p53: the barrier to cancer stem cell formation. **FEBS Lett** 2014; 588:2580-9.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res** 1987; 95:229-49.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. **Science** 1989; 244:217-21.

Bandieramonte G, Colecchia M, Mariani L, et al. Peniscopically controlled CO2 laser excision for conservative treatment of in situ and T1 penile carcinoma: report on 224 patients. **Eur Urol** 2008; 54:875-82.

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

Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. **Oncogene** 1991; 6:1699-703.

Beggs JH, Spratt JS Jr. Epidermoid carcinoma of the penis. **J Urol** 1964; 91:166-72.

Bevan-Thomas R, Slaton JW, Pettaway CA. Contemporary morbidity from lymphadenectomy for penile squamous cell carcinoma: the MD Anderson Cancer Center Experience. **J Urol** 2002; 167:1638-42.

Bezerra A.L, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis. **Cancer** 2001; 91:2315-21.

Bracken RB, Diokno AC. Melanoma of the penis and the urethra: 2 case reports and review of the literature. **J Urol** 1974; 111:198-200.

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

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology** 2002; 40:2-11.

Brumini R. **Câncer no Brasil? dados histopatológicos**. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde - Campanha Nacional de Combate ao Câncer, 1982.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med** 1989; 18:432-7.

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer** 1977; 39:456-66.

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

Catalona WJ. Role of lymphadenectomy in carcinoma of the penis. **Urol Clin North Am** 1980; 7:785-92.

Catalona WJ. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the penis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. **J Urol** 1988; 140:306-10.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J Pathol** 1992; 168:357-63.

Chan PK, Liu QR, Durban E. The major phosphorylation site of nucleophosmin (B23) is phosphorylated by a nuclear kinase II. **Biochem J** 1990; 270:549-52.

Chang JH, Olson MO. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. **J Biol Chem** 1990; 265:18227-33.

Chaux A, Velazquez EF, Algaba F, Ayala G, Cubilla AL. Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. **Urology** 2010;76:S7-S14.

Chen M, Huang J, Zhu Z, Zhang J, Li K. Systematic review and meta-analysis of tumor biomarkers in predicting prognosis in esophageal cancer. **BMC Cancer** 2013; 13:539.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Nucleophosmin, p53, and Ki-67 expression patterns on an oral squamous cell carcinoma tissue microarray. **Hum Pathol** 2010; 41:1079-86.

Crook J, Ma C, Grimard L. Radiation therapy in the management of the primary penile tumor: an update. **World J Urol** 2009; 27:189-96.

Cox DR. Regression models and life tables. **J Royal Stat Society Ser B** 1972; 34:187-220.

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

da Costa WH, Rosa de Oliveira RA, Santana TB, et al. Prognostic factors in patients with penile carcinoma and inguinal lymph node metastasis. **Int J Urol** 2015; 22:669-73.

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

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 1992; 356:215-21.

Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. **Cell Prolif** 1996; 29:1-12.

Edge SB, Byrd DR, Compton C, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer; 2009. Penis; p.447-56.

Ekstrom T, Edsmyr F. Cancer of the penis; a clinical study of 229 cases. **Acta Chir Scand** 1958; 115:25-45.

Eliyahu D, Michalovitz D, Oren M. Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. **Nature** 1985; 316:158-60.

Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. **Nature** 1984; 312:646-9.

Epstein JH, Cubilla AL, Humphrey PA. **Atlas of tumor pathology: tumors of the prostate gland, seminal vesicles, penis, and scrotum**. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 2011. The penis; p.405-612. (AFIP Atlas of Tumor Pathology: Series 4)

Esrig D, Spruck CH 3rd, Nichols PW, et al. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. **Am J Pathol** 1993; 143:1389-97.

Faria SM, Martins ACP, Velludo MASL, et al. Imunoexpressão do Ki-67 no carcinoma do pênis. **Acta Cir Bras** 2000; 15 Supl 2:31-3.

Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. **Nature** 1992; 358:83-6.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-91; discussion 591-3.

Feuerstein N, Mond JJ. "Numatrin," a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B lymphocytes. **J Biol Chem** 1987; 262:11389-97.

Feuerstein N, Randazzo PA. In vivo and in vitro phosphorylation studies of numatrin, a cell cycle regulated nuclear protein, in insulin-stimulated NIH 3T3 HIR cells. **Exp Cell Res** 1991; 194:289-96.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell** 1989; 57:1083-93.

Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. **Mol Cell Biol** 1988; 8:531-9.

Fraley EE, Zhang G, Sazama R, Lange PH. Cancer of the penis prognosis and treatment plans. **Cancer** 1985; 55:1618-24.

Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. **Mol Cell Biol** 1992; 12:2866-71.

Fritschy JM. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. **Eur J Neurosci** 2008; 28:2365-70.

García-Tello A, Angulo JC, Andrés G, Ramón de Fata F, Sánchez-Chapado M, López JI. Impact of p53, MIB-1 and PECAM-1 expression on the prognosis of urothelial carcinoma of the renal pelvis. **Actas Urol Esp** 2014; 38:506-14.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer** 1983; 31:13-20.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol** 1984; 133:1710-5.

Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. **Semin Cancer Biol** 1990; 1:199-206.

Gil AO, Pompeo A, Sarkis Á, Matsuo M, Motta TH, Arap S. Evaluation of the influence of protein p53 in penile carcinoma. **Int Braz J Urol** 2002; 28:33-9.

Göhring UJ, Scharl A, Heckel C, Ahr A, Crombach G. P53 protein in 204 patients with primary breast carcinoma--immunohistochemical detection and clinical value as a prognostic factor. **Arch Gynecol Obstet** 1995; 256:139-46.

Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:493-505.

Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Pandolfi PP. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. **Nature** 2005; 437:147-53.

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; discussion 534.

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

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

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

Hakenberg OW, Compérat EM, Minhas S, et al. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. **Eur Urol** 2015; 67:142-50.

Hashimoto N, Tachibana M, Dhar DK, Yoshimura H, Nagasue N. Expression of p53 and RB proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus: their relationship with clinicopathologic characteristics. **Ann Surg Oncol** 1999; 6:489-94.

Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. **Cell Prolif** 1996; 29:413-25.

Herrera JE, Correia JJ, Jones AE, Olson MO. Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23. **Biochemistry** 1996; 35:2668-73.

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

Hoppmann HJ, Fraley EE. Squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 1978; 120:393-8.

Horenblas S, Jansen L, Meinhardt W, Hoefnagel CA, de Jong D, Nieweg OE. Detection of occult metastasis in squamous cell carcinoma of the penis using a dynamic sentinel node procedure. **J Urol** 2000; 163:100-4.

Horenblas S, Van Tinteren H, Delemarre JF, Moonen LM, Lustig V, Kröger R. Squamous cell carcinoma of the penis: accuracy of tumor, nodes and metastasis classification system, and role of lymphangiography, computerized tomography scan and fine needle aspiration cytology. **J Urol** 1991; 146:1279-83.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell** 1994; 79:573-82.

Inada S, Koto T, Futami K, Arima S, Iwashita A. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). **Surg Today** 1999; 29:493-503.

Jiang P, Du W, Yang X. p53 and regulation of tumor metabolism. **J Carcinog** 2013; 12:21.

Jones CE, Busch H, Olson MO. Sequence of a phosphorylation site in nucleolar protein B23. **Biochim Biophys Acta** 1981; 667:209-12.

Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. **Cell** 1997; 91:649-59.

Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature** 2013; 502:333-339.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Statist Assoc** 1958; 53:457-81.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res** 1991; 51:6304-11.

Kayes O, Ahmed HU, Arya M, Minhas S. Molecular and genetic pathways in penile cancer. **Lancet Oncol** 2007a; 8:420-9.

Kayes O, Minhas S, Allen C, Hare C, Freeman A, Ralph D. The role of magnetic resonance imaging in the local staging of penile cancer. **Eur Urol** 2007b; 51:1313-8; discussion 1318-9.

Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T. The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. **Am J Surg** 1999; 177:497-502.

Krishna RP, Sistla SC, Smile R, Krishnan R. Sonography: an underutilized diagnostic tool in the assessment of metastatic groin nodes. **J Clin Ultrasound** 2008; 36:212-7.

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. **Nature** 1997; 387:299-303.

Kuo ML, den Besten W, Bertwistle D, Roussel MF, Sherr CJ. N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. **Genes Dev** 2004; 18:1862-74.

Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. **Mol Cell Biol** 1986; 6:1379-85.

Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a000893.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature** 1979; 278:261-3.

Lane DP. Cancer p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:15-6.

Leal MF, Mazzotti TK, Calcagno DQ, et al. Deregulated expression of Nucleophosmin 1 in gastric cancer and its clinicopathological implications. **BMC Gastroenterol** 2014; 14:9.

Leijte JA, Kirrander P, Antonini N, Windahl T, Horenblas S. Recurrence patterns of squamous cell carcinoma of the penis: recommendations for follow-up based on a two-centre analysis of 700 patients. **Eur Urol** 2008; 54:161-8.

Leijte JA, Graafland NM, Valdés Olmos RA, van Boven HH, Hoefnagel CA, Horenblas S. Prospective evaluation of hybrid 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in staging clinically node-negative patients with penile carcinoma. **BJU Int** 2009; 104:640-4.

Leijte JA, Kroon BK, Valdés Olmos RA, Nieweg OE, Horenblas S. Reliability and safety of current dynamic sentinel node biopsy for penile carcinoma. **Eur Urol** 2007; 52:170-7.

Levesque MA, Katsaros D, Yu H, et al. Immunofluorometrically determined p53 accumulation as a prognostic indicator in Italian breast cancer patients. **Int J Cancer** 1998; 79:147-52.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. **Nature** 1991; 351:453-6.

Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. **Cancer Detect Prev** 2006; 30:481-90.

Londero AP, Orsaria M, Tell G, et al. Expression and prognostic significance of APE1/Ref-1 and NPM1 proteins in high-grade ovarian serous cancer. **Am J Clin Pathol** 2014; 141:404-14.

Lont AP, Besnard AP, Gallee MP, van Tinteren H, Horenblas S. A comparison of physical examination and imaging in determining the extent of primary penile carcinoma. **BJU Int** 2003; 91:493-5.

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

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

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

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

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Malkin D. Li-fraumeni syndrome. **Genes Cancer** 2011; 2:475-84.

Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. **Mol Cell Biol** 1984; 4:1689-94.

Mamrack MD, Olson MO, Busch H. Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar nonhistone protein C23. **Biochemistry** 1979; 18:3381-6.

Meek DW, Anderson CW. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2009; 1:a000950.

Menendez S, Camus S, Izpisua Belmonte JC. p53: guardian of reprogramming. **Cell Cycle** 2010; 9:3887-91.

Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Penile cancer. **J Am Acad Dermatol** 2006; 54:369-91; quiz 391-4.

Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Invasive penile carcinoma: a review. **Dermatol Surg** 2004; 30:311-20.

Minhas S, Kayes O, Hegarty P, Kumar P, Freeman A, Ralph D. What surgical resection margins are required to achieve oncological control in men with primary penile cancer? **BJU Int** 2005; 96:1040-3.

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

Mohs FE, Snow SN, Messing EM, Kuglitsch ME. Microscopically controlled surgery in the treatment of carcinoma of the penis. **J Urol** 1985; 133:961-6.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. **Cell** 1992; 69:1237-45.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. **Science** 1994; 263:1281-4.

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

Murata A, Baba Y, Watanabe M, et al. p53 immunohistochemical expression and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Med Oncol** 2013; 30:728.

Norberg T, Lennerstrand J, Inganäs M, Bergh J. Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. **Int J Cancer** 1998; 79:376-83.

Novara G, Galfano A, De Marco V, Artibani W, Ficarra V. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **Nat Clin Pract Urol** 2007; 4:140-6.

Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. **Cell** 2000; 103:127-40.

Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. **FEBS Lett** 2001; 506:272-6.

Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. **J Biochem** 2008; 143:441-8.

Ornellas AA, Nóbrega BL, Wei Kin Chin E, Wisnescky A, da Silva PC, de Santos Schwindt AB. Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. **J Urol** 2008a; 180:1354-9.

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

Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. **Nature** 1984; 312:649-51.

Perry ME. The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a000968.

Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. **Cell** 1990; 60:791-801.

Pich A, Chiusa L, Formiconi A, et al. Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder. **Cancer** 2002; 95:784-90.

Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, et al. EAU penile cancer guidelines 2009. **Eur Urol** 2010; 57:1002-12.

Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sang JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology** 2010; 76:S2-6.

Pow-Sang MR, Benavente V, Pow-Sang JE, et al. Cancer of the penis. **Cancer Control** 2002; 9:305-14.

Protzel C, Alcaraz A, Horenblas S, Pizzocaro G, Zlotta A, Hakenberg OW. Lymphadenectomy in the surgical management of penile cancer. **Eur Urol** 2009; 55:1075-88.

Ravi R. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. **Br J Urol** 1993; 72:817-9.

Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. **Blood** 1996; 87:882-6.

Riveros M, Lebron RF. Geographical pathology of cancer of the penis. **Cancer** 1963; 16:798-811.

Robey EL, Schellhammer PF. Four cases of metastases to the penis and a review of the literature. **J Urol** 1984; 132:992-4.

Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, Andrada-Serpa MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. **Int Braz J Urol** 2008; 34:467-74; discussion 475-6.

Schlenker B, Scher B, Tiling R, et al. Detection of inguinal lymph node involvement in penile squamous cell carcinoma by 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT: a prospective single-center study. **Urol Oncol** 2012; 30:55-9.

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol** 1993; 123:513-22.

Schmidt-Zachmann MS, Hügle-Dörr B, Franke WW. A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. **EMBO J** 1987; 6:1881-90.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol** 2000; 182:311-22.

Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:4495-9.

Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:731-7.

Solsona E, Algaba F, Horenblas S, Pizzocaro G, Windahl T. EAU Guidelines on Penile Cancer. **Eur Urol** 2004; 46:1-8.

Solsona E, Iborra I, Ricós JV, et al. Corpus cavernosum invasion and tumor grade in the prediction of lymph node condition in penile carcinoma. **Eur Urol** 1992; 22:115-8.

Soria JC, Fizazi K, Piron D et al. Squamous cell carcinoma of the penis: multivariate analysis of prognostic factors and natural history in monocentric study with a conservative policy. **Ann Oncol** 1997; 8:1089-98.

Sotelo R, Sánchez-Salas R, Carmona O, et al. Endoscopic lymphadenectomy for penile carcinoma. **J Endourol** 2007; 21:364-7; discussion 367.

Spolverato G, Ejaz A, Azad N, Pawlik TM. Surgery for colorectal liver metastases: The evolution of determining prognosis. **World J Gastrointest Oncol** 2013; 5:207-21.

Srinivas V, Morse MJ, Herr HW, Sogani PC, Whitmore WF Jr. Penile cancer: relation of extent of nodal metastasis to survival. **J Urol** 1987; 137:880-2.

Takiar R, Kumar S. Pattern of reproductive cancers in India. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:599-603.

Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T, Terada M. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. **Cancer Res** 1992; 52:3372-7.

Tanis PJ, Lont AP, Meinhardt W, Olmos RA, Nieweg OE, Horenblas S. Dynamic sentinel node biopsy for penile cancer: reliability of a staging technique. **J Urol** 2002; 168:76-80.

Tobias-Machado M, Tavares A, Molina WR Jr, Forseto PH Jr, Juliano RV, Wroclawski ER. Video endoscopic inguinal lymphadenectomy (VEIL): minimally invasive resection of inguinal lymph nodes. **Int Braz J Urol** 2006; 32:316-21.

Tsui KH, Cheng AJ, Chang Pe, Pan TL, Yung BY. Association of nucleophosmin/B23 mRNA expression with clinical outcome in patients with bladder carcinoma. **Urology** 2004; 64:839-44.

Tsui KH, Juang HH, Lee TH, Chang PL, Chen CL, Yung BY. Association of nucleophosmin/B23 with bladder cancer recurrence based on immunohistochemical assessment in clinical samples. **Acta Pharmacol Sin** 2008; 29:364-70.

van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. **Am J Clin Pathol** 1998; 110:24-31.

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov** 2008; 7:979-87.

Velazquez EF, Amin MB, Epstein JI, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the penis. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:923-9.

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

Wang D, Umekawa H, Olson MO. Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. **Cell Mol Biol Res** 1993; 39:33-42.

Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. **Nat Cell Biol** 2005; 7:823-30.

Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. **Nat Cell Biol** 1999; 1:20-6.

Wespes E, Simon J, Schulman CC. Cabanas approach: is sentinel node biopsy reliable for staging penile carcinoma? **Urology** 1986; 28:278-9.

Wolf D, Rotter V. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. **Mol Cell Biol** 1984; 4:1402-10.

Wolf D, Rotter V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985; 82:790-4.

Yaziji H, Barry T. Diagnostic immunohistochemistry: what can go wrong? **Adv Anat Pathol** 2006; 13:238-46.

Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, et al. The t(3;5)(q251;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. **Oncogene** 1996; 12:265-75.

Yung BY, Chan PK. Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. **Biochim Biophys Acta** 1987; 925:74-82.

Yung BY, Busch H, Chan PK. Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 51) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. **Biochim Biophys Acta** 1985; 826:167-73.

Yung BY. Oncogenic role of nucleophosmin/B23. **Chang Gung Med J** 2007; 30:285-93.

Zequi SC. **Correlação entre os fatores clínicos e anatomopatológicos associados aos índices de proliferação celular e como prognósticos em portadores de câncer do rim tratados por cirurgia.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

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.

Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W, Pelech S. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. **J Biol Chem** 2004; 279:35726-34.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 17 de Dezembro de 2010.

Ao
Dr. Ademar Lopes

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1478/10
“Análise da expressão nucleofosmina, p53 e Ki-67 como fatores prognósticos em câncer de pênis”.

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP em sua reunião de 23/11/2010. Os membros consideraram como **pendente** a realização desta pesquisa. Há a necessidade de esclarecimento das solicitações feitas conforme parecer consubstanciado em anexo.

Salientamos ainda que, se não houver reapresentação ao CEP do referido projeto no prazo máximo de 60 dias o mesmo será considerado retirado.

Atenciosamente,

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

1/1

Apêndice 1 - Ficha de levantamento de dados.

Dados Gerais

- 1.Nº do AP.....|_|_|_|_|_|
- 2.Data do AP: ___/___/___
- 3.RGH.....|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|
- 4.Nome: _____
- 5.Revisto: (m) microfilme(p) prontuário|_|
- 6.Idade a Admissão (anos).....|_|_|_| Data da Admissão: ___/___/___
7. Data de Nascimento: ___/___/___
- 8.Cidade: _____
- 9.UF: _____
- 10.Telefone: _____

Dados Epidemiológicos

11. Estado Civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) Divorciado (5) Outros (9) Ign.....|_|
- 12.Raça : (1) Branca (2) Amarela (3) Negro (4) Parda (9) Ign.....|_|
13. Orientação sexual: (1) Heterossexual (2) Homossexual (3) Bissexual (8) Não avaliável.....|_|
14. Hábitos sexuais: (1) Parceira(o) única(o) (2) Múltiplas(os) parceiras(os) (8) Não Avaliável.....|_|
15. Idade do primeiro coito.....|_|_|
- 16.Antecedentes Venéreos: (0) Não (1) Sim (9) Ign.....|_|
17. Se Sim, qual(s)?: (1) Gonorréia (2) Condiloma Acuminado (3) Uretrites (4) Lues (5) HIV+/AIDS (6) Outras _____ (9) Ign.....|_|
18. Sinais / Sintomas: (1) Ferida (2) Dor (3) Inflamação (4) Disúria (5) Prurido (6) Outros _____ (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
- 19.Tempo de Evolução (meses): (se ignorado 9999).....|_|_|
20. Doenças prévias relacionadas: (0) Não (1) Balanite Xerotica Obliterante (2) Liquen escleroso (3) E. Queyrat (4) D. Bowen (5) Papulose Bowenóide (6) Balanopostite crônica (7) Condiloma (8) Fimose (9) Outros _____ (88) Não se aplica (99) Ign.....|_|
21. Postectomia: (0) Não (1) Não relacionada (2) Relacionada (3) Ao nascimento (4) Infancia/Adolesc (5) Vida Adulta (6) Recente (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|

22. Situação a 1ª consulta: (1) Biopsiado (2) Amputado (3) Esvaziado (4) Intacto (9) Ign.....|_|
23. Tumor (AJCC 6): (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx.....|_|
24. Linfonodos (AJCC 6):: (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (9) Nx.....|_|
25. Metástases (AJCC 6):: (0) M0 (1) M1 (9) Mx.....|_|
26. Estadiamento Clínico (AJCC 6): (0) EC0 (1) ECI (2) ECII (3) ECIII (4) EC IV (9) Ign.....|_|
27. Classificação de Jackson: (1) St I (2) St II (3) St III (4) St IV (9) Ign.....|_|
28. Tumor (AJCC 7): (0) Tis (1) Ta (2) T1a (3) T1b (4) T2 (5) T3 (6) T4 (9) Tx.....|_|
29. Linfonodos (AJCC 7): (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (9) Nx.....|_|
30. Metástases (AJCC 7): (0) M0 (1) M1 (9) Mx.....|_|
31. Estadiamento Clínico (AJCC 7): (0) EC0 (1) ECI (2) ECII (3) ECIIIa (4) ECIIIb (5) EC IV..|_|
32. Cirurgia: (1) Amp. Parcial (2) Amp. Total (3) Exérese (4) Postectomia (5) AIIA – Inter-ileoabdominal (6) Emasculação (9) ign.....|_|
33. Data da amputação / ressecção..... _/ _/ _
34. Complicações relacionadas a cirurgia: (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) Estenose (4) Hemorragia (5) Outras _____ (9) Ign.....|_|
35. Tipo de espécime: (1) Biópsia Incisional (2) Biópsia excisional (3) Penectomia Parcial (4) Penectomia Total (5) Circuncisão (6) Recorrência em coto (7) Linfonodo isolado(8) Metástase (9) Outros _____ (99) Ign.....|_|
36. Localização do tumor: (1) Glânde (2) Prepúcio (3) Sulco Balanoprepucial (SBP) (4) Glânde e SBP (predominantemente glânde, >70%) (5) Prepúcio e sulco SBP (predominantemente prepúcio, >70%) (6) Pele (7) Uretra Peniana (8) Múltiplos sítios Quais? (9) Ign.....|_|
37. Padrão de Crescimento: (1) Crescimento superficial (2) Crescimento Vertical (3) Verruciforme (4) Mais de um padrão: _____ (9) Ign.....|_|
38. Lesões associadas: (1) Placa (2) Pápula (3) Nódulo (4) Úlcera (5) Outras (9) Ign.....|_|
- Macroscopia:
39. Tamanho do da peça cirúrgica do pênis (cm).....|_|
40. Tamanho do Tumor (cm)|_|
41. Distância do tumor à margem (cm)|_|
42. Localização (macroscopia): (1) Glânde (2) Prepúcio (3) Sulco bálano – prepucial (4) Corpo (5) Uretra (6) Tumor multicêntrico (7) Escroto (8) Não avaliável (9) Recidiva

inguinal – interílio (10) Tu em coto recidiva (11) Outras _____ (99)

Ign.....|_|

43. Invasão (macroscopia) : (0) Não tem (1) Corpo esponjoso (2) Corpo cavernoso (3) Uretra (4) Osso (5) Raiz pênis (6) Pele (7) Escroto (8) Não avaliável (9) Outras _ (99)

Ign.....|_|

Histologia

44. Histologia: (1) CEC (2) Warty (3) Papilar (4) Giant condiloma (5) Sarcomatoide (6) Sendo glandular (7) Cuniculatum (8) Basaloide (9) Verrucoso (10) Warty – basaloide (11) Uretra (12) Pseudo hiperplasia (13) Adeno – esquamoso (14) Mixed (15) Anaplásico (16) Verrucosso Invasivo (17) Warty invasivo (18) Outros _ (99) Ign.....|_|

45. Bordas : (1) Pushing (2) Infiltrating (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

46. Margem: (0) Negativa (1) Positiva (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

47. Grau (Histológico): (1) baixo grau (2) intermediário (3) alto grau (8) não avaliável (9)

Ign.....|_|

48. Local anatômico-AP: (1) Lamina Própria (2) Corpo Esponjoso (3) Corpo Cavernoso (4) Dartus (5) Pele (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|

49. Corpo esponjoso-AP: (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

50. Corpo cavernoso-AP: (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

51. Glande: (0) Negativo (1) Lâmina própria (2) Corpus spongiosum (3) Corpora Cavernosa (incluído túnica albigínea) (9) Ign.....|_|

52. Prepúcio: (0) Negativo (1) Lâmina Própria (2) Dartos (3) Pele (9) Ign.....|_|

53. Sulco balanoprepucial: (0) Negativo (1) Lâmina Própria (2) Dartos (3) Fâscia de Buck (9) ign.....|_|

54. Uretra-AP: (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

55. Invasão vascular-AP: (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

56. Invasão perineural-AP: (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

57. pT(AJCC7): (0) Tx (1) T0 (2) Tis (3) Ta (4) T1a (5) T1b (6) T2 (7) T3 (8) T4 (9) Ign.....|_|

58. Thickness-AP (mm).....|_|

59. Index- 1/2/3/4/5/6 e (8) Não avaliável.....|_|

60. Infiltração de órgãos adjacentes: (0) Não (1) Presente (8) Não avaliável (9) Ign.....|_|

61. Alteração sugestiva de HPV (coilocitose): (0) Ausente (1) Presente (9) Ign.....|_|

62. pN(AJCC7): (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (4) Nx (9) Ign.....|_|

63. pM(AJCC7): (0) M0 (1) M1 (9) Ign.....|_|

64. Hiperplasia escamosa (Hiperesc): (0) Ausente (1) Presente (8) Não avaliado (9) Ign....|_|

65. Tipo Hiperplasia escamosa (Thiperesc): (0) Flat (1) Papilar (2) Pseudoepiteliomatosa (3) Verrucosa (4) Outras (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|
66. Lesão Superficial In Situ (SIL): (0) Não tem (1) Baixo grau (2) Alto grau (8) Não avaliado (9)Ign.....|_|
67. Tipo de Lesão Superficial In Situ (TSIL): (0) Warty (1) Escamoso (2) Basalóide (3) Warty-basalóide (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|
68. Líquen Escleroso (LS): (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|
69. Tipo de Líquen Escleroso (TLS): (0) Típico (1) Atípico (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|
70. Uretral: (0) Sil negativo (1) Sil positivo (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|
- Esvaziamento Ganglionar
71. Data do Esvaziamento: ____/____/____
72. Tipo esvaziamento ganglionar: (0) Não (1) Inguinal (2) Inguino-iliaco (3) Outros _____ (9) Ign.....|_|
73. Intenção do esvaziamento : (1) Principio (2) Necessidade (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
74. Lateralidade do esvaziamento: (1) Unilateral (2) Bilateral (8) Não se aplica (9) Ign...|_|
75. Complicações relacionadas esvaziamento: (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) Hematoma (4) Necrose (5) Linfedema (6) Ruptura de vasos (7) Outras _____ (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
76. Total de Linfonodos examinados (se Ignorado 9999).....|_|_|_|
77. Total de Linfonodos positivos.....|_|_|_|
78. Lateralidade linfonodos positivos: (1) Unilat (2) Bilateral (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
- 79.Cadeia Positiva: (1) Inguinal (2) Inguinal+Ilíaco (3) Iliaco (4) Outras _____ (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
- Adjuvancia
80. Adjuvancia: (0) Não (1) Quimioterapia (2) Radioterapia (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
81. Recidiva / Seguimento
82. Data da recidiva....._/___/___
83. Local da recidiva: (0) Não (1) Coto (2) Regional (3) Pulmões (4) Ossos (5) Fígado (6) Outros _____ (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
84. Tratamento da recorrência; (0) Não (1) Amputação (2) Linfadenectomia (3) Rxt (4) Qt (5) Cirurgia meta (6) Outros _____ (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|
85. Data do ultimo seguimento....._/___/___

86. Situação no seguimento: (1) Vivo s/ doença (2) Vivo com doença (3) Óbito por Câncer
(4) Óbito por outra causa (5) Perdido de vista (9) Ign

87. NPM....._____

88. p53....._____

89. Ki67....._____