

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA
CICLINA D1 EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
PÊNIS: CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E
ANATOMOPATOLÓGICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E
AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS**

AUGUSTO MODESTO DE SOUZA NETO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de mestre**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando A. Soares

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Souza Neto, Augusto Modesto

Estudo da expressão imunoistoquímica da ciclina D1 em carcinoma espinocelular de pênis: correlação com variáveis clínicas e anatomopatológicas para identificação e avaliação de fatores prognósticos / Augusto Souza Modesto Neto -- São Paulo, 2008.

110p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1. CÂNCER DO PÊNIS. 2. IMUNOISTOQUÍMICA
3. CICLINA D1. 4. CARCINOMA ESPINOCELULAR. 5. PROGNÓSTICO.

DEDICATORIAS

A meus pais, Antonio e Teresa, pela dedicação, amor e carinho. Maiores incentivadores e colaboradores da minha formação, dos meus projetos e objetivos de vida.

Aos meus irmãos, dos quais tenho muito orgulho: Toni, o meu melhor amigo e companheiro de todos os momentos. Aos caçulas, Mina e Tiago, pelo apoio, carinho e confiança. Espero que nossa união continue e se reforce a cada dia.

A Ana Carla, minha esposa, companheira e amiga, por personificar tudo que espero em uma relação. Pela dedicação, paciência e carinho, sempre incansável e buscando a perfeição em tudo o que faz. Você é parte integrante desta realização conseguida por nós.

A João Vitor, meu filho, sem dúvida o meu maior tesouro. Motivo de inspiração e incentivo para tudo que faço.

A meu avô Augusto, pelo exemplo de vida e de família. Por todos os momentos maravilhosos que me proporcionou.

A minha avó Maria, minha madrinha, exemplo de simplicidade, por todo o carinho a mim dedicado, exemplo de mãe sempre presente e prestativa.

A meu avô Renato, pelo carinho.

A José Carlos, meu sogro, pela sua sabedoria e experiência de vida e a Regina, minha sogra, pelo seu dinamismo, determinação e capacidade.

As minhas cunhadas Cristiana e Ana Paola e ao meu cunhado Elias,
por todo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo, meu orientador e amigo, grande incentivador, que tornou possível a realização deste trabalho. Muito obrigado pela confiança e pela sua sempre cuidadosa participação em todas as etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, pelo exemplo de líder, eficiência e dedicação indispensáveis para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marjo Perez, Chefe do Serviço de Urologia da Disciplina de Cirurgia da Santa Casa de São Paulo, pelo apoio e confiança ao longo da minha caminhada

Aos professores e preceptores da Santa Casa de São Paulo, onde desde 1999, fui calorosamente acolhido, uma escola médica completa, em termos éticos, técnicos e principalmente, sociais. Muito obrigado por me ensinar uma medicina verdadeira, diferente e atualizada.

Ao Hospital A.C. Camargo, excelência em ensino e pesquisa, instituição que prima não apenas pela docência, mas também pelo alto nível das suas publicações internacionais.

Ao Dr. Roni de Carvalho Fernandes, pela competência, relação médico-paciente primorosa e dedicação admirável. Responsável e incentivador por todas as etapas da minha formação médica, com participação direta e indiretamente em todas elas. Pelo seu dinamismo e objetividade em tudo que faz. Pelo apoio nas decisões mais difíceis, muitas vezes aconselhando-me como irmão mais velho.

A Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, pelo convite e pela oportunidade de realizar este trabalho. Pela ajuda, apoio e incentivo desde o início até o final desta realização, principalmente na análise estatística dos dados. Pela confiança e pela amizade.

A Dr. Marcos Lima de Oliveira Leal, pela paciência, companherismo e ajuda na confecção do banco de dados. Pela sinceridade, lealdade e amizade cada vez mais forte.

A Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, exemplo de pessoa e de amigo. Por ser o primeiro incentivador para a realização deste trabalho e pelo importante apoio nas dúvidas e questões estatísticas.

A Dr. Luis Gustavo de Morato Toledo, pela amizade verdadeira, pelo companherismo ao longo desses anos, pelo apoio incondicional, pelos conselhos e pelas críticas, muitas vezes, pertinentes. Conte comigo sempre.

Aos Drs. Marcos Broglio e Isabel Cristina de Albuquerque Feitosa, companheiros de residência e amigos nas horas mais difíceis.

Ao Dr. Adalberto Andriolo Junior, pelos conselhos sempre pertinentes, pelo apoio e amizade.

Aos amigos e companheiros de trabalho, Dr. Rodrigo Wilson, Dr. Antonio João de Aquino, Dr. Gustavo Cuck, Dr. Fernando Korkes, Dr. Luiz Renato Guidoni, pela ajuda, apoio e amizade.

Aos colegas, Dr. Silvio da Ressureição Pires, Dr. Dalmo de Barros, Dr. Márcio Rosa Pagan, Dr. Cristian Fuhro, Dr. Celso de Oliveira, Dr. Lívio Beneduzzi, Dr. Júlio Máximo, Dr. Ricardo Léo Roberto Felts De La Roca, Dr.

Armando Bochaerts Neto, pelos ensinamentos fundamentais à minha formação e pelo apoio.

A Sra. Hirde Contesini, pela colaboração, dedicação primorosa e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

A Sra. Suely Francisco, bibliotecária do Hospital A.C.Camargo, pelas sugestões, orientações e revisão desta dissertação. Pela simpatia e atenção que exaltam ainda mais as suas qualidades.

A Sra. Luciana Pitombeira e Ana Maria da pós graduação do Hospital A.C.Camargo, pelo cuidado, organização e competência.

RESUMO

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

Introdução: O tratamento para o câncer invasivo do pênis baseia-se fundamentalmente na amputação do tumor primário e na linfadenectomia regional. A presença de metástase linfonodal, constitui o fator prognóstico mais importante. A baixa acuracidade dos métodos de estadiamento da doença linfonodal e a alta taxa de morbidade da linfadenectomia tem estimulado o estudo de novos fatores prognósticos preditivos de metástases em linfonodos, facilitando a seleção de pacientes a serem submetidos à linfadenectomia. **Objetivos:** O presente trabalho visa não só estudar a expressão imunoistoquímica da ciclina D1 no carcinoma peniano, mas também analisar o valor prognóstico dessa expressão correlacionando-a com variáveis clínicas, demográficas e anatomopatológicas, tendo como estimadores de prognóstico, a ocorrência de metástases linfonodais e as taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global. **População e Métodos:** Foram avaliados retrospectivamente, 333 pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular do pênis submetidos ao tratamento do tumor primário e a linfadenectomia radical ou aqueles submetidos ao tratamento do tumor primário, não linfadenectomizados, com pelo menos cinco anos de seguimento. **Resultados:** Em relação à expressão imunoistoquímica da ciclina D1, o grau de diferenciação histológico, embolização venosa, infiltração de corpos cavernosos e infiltração de uretra, foram variáveis com significância estatística na análise univariada. Porém, somente o grau de diferenciação histológico foi significativo na análise multivariada. O grau de diferenciação histológico, permeação linfática,

embolização venosa, infiltração de corpos cavernosos e infiltração de uretra foram variáveis estatisticamente significantes para o risco de metástase linfonodal na análise univariada. Entretanto, somente permeação linfática e grau de diferenciação histológico apresentaram-se como variáveis independentes para o risco de metástase linfonodal. A taxa de sobrevida livre de doença foi de 76,9% em cinco anos. As variáveis independentes para a sobrevida livre de doença foram presença de metástase linfonodal, grau de diferenciação histológica e espessura tumoral. A taxa de sobrevida global em 5 e 10 anos foram respectivamente de 73,1% e 57,1%. As variáveis independentes para o risco de óbito foram a presença de metástase linfonodal e permeação linfática. A expressão imunoistoquímica da ciclina D1 não apresentou significância estatística nem para a sobrevida global, nem tão pouco para a sobrevida livre de doença. **Conclusões:** A expressão imunoistoquímica da ciclina D1 no carcinoma peniano apresentou correlações com variáveis patológicas estatisticamente significativas, porém não pode ser utilizada isoladamente como fator de prognóstico no tratamento do carcinoma peniano, pois não mostrou nenhuma significância estatística quando correlacionada com a presença de metástase linfonodal.

SUMMARY

Souza Neto AM. [Evaluation of the immunohistochemical expression of cyclin D1 in epidermoid carcinoma of the penis: correlation clinical and pathologic variables to predict prognostic factors]. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The treatment for invasive cancer of the penis is based, mainly in amputating the primary tumor and in the regional lymphadenectomy. The presence of lymph node metastasis has constituted the most important prognostic factor up to now. The low accuracy of the staging of the lymph node disease and the high level of morbidity of lymphadenectomy stimulates the study of new prognostic factors that predetermine the occurrence of lymph node metastasis intending to support the selection of patients that will be submitted to lymphadenectomy. **Objective:** This study aims not only to examine the immunohistochemical expression of cyclin D1 in the carcinoma of the penis, but also to analyze the prognostic value of this expression correlating it to clinical, demographical and pathological variables intending to identify prognostic factors related to the presence of lymph node metastasis and survival (disease-free and overall). **Population and methods:** It has been evaluated 333 patients with the diagnostic of squamous cell carcinoma of the penis treated with resection of the primary tumor and lymphadenectomy or resection of the primary tumor and 5 years of follow-up without lymphadenectomy. **Results:** Considering the immunohistochemical expression of the cyclin D1 the degree of histological differentiation, venous embolization, cavernous body and urethra infiltration were statistically significant in the univariate analysis. Only the degree of histological differentiation was statistically significant in the multivariate analysis. The degree of histological differentiation, lymphatic permeation, venous embolization, cavernous body and urethra infiltration were statistically significant in the univariate analysis for the risk of lymph node metastasis.

However, only lymphatic permeation and degree of histological differentiation were statistically significant for the risk of lymph node metastasis in the multivariate analysis. The disease-free survival rate was 76.9% in five years. The independent variables of disease-free survival rate were: presence lymph node metastasis, degree of histological differentiation and thickness of tumor invasion. The rate of overall survival for 5 and 10 years has been respectively 73.1% and 57.1%. The independent variables for the risk of death were: presence of lymph node metastasis and lymphatic permeation. The immunohistochemical expression of cyclin D1 in the penile carcinoma wasn't statistically significant for the survival rates (disease-free and overall).

Conclusions: The immunohistochemical expression of cyclin D1 in penile carcinoma can be correlated to pathological variables although it can't be used alone as a prognostic factor for the treatment of penile carcinoma, since it didn't show statistic significance when correlated to the presence of lymph node metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regulação da atividade transcricional do E2F através do ciclo celular	22
Figura 2	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular pouco diferenciado demonstrando negatividade para proteína ciclina D1 nas células malignas. Fotomicrografia de carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado demonstrando positividade para proteína ciclina D1 nas células malignas.	39
Figura 3	Curva de sobrevida livre de doença para 333 pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.	60
Figura 4	Curva de sobrevida global para 333 pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.	65
Figura 5	Curva de sobrevida câncer específica para 333 pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Categorização dos grupos para análise no estudo.	40
Tabela 2	Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	42
Tabela 3	Frequência das variáveis anatomopatológicas dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	44
Tabela 4	Número e porcentagem de pacientes segundo complicação relacionada à amputação de pênis em 333 pacientes de carcinoma peniano.	45
Tabela 5	Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 333 pacientes portadores de câncer de pênis.	45
Tabela 6	Número e porcentagem de linfonodos metastáticos nos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	47
Tabela 7	Número e porcentagem de pacientes segundo tipo de esvaziamento realizado.	47
Tabela 8	Número e porcentagem de pacientes segundo complicação relacionada à linfadenectomia em 333 pacientes de carcinoma peniano.	48
Tabela 9	Situação clínica dos 333 pacientes de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.	49
Tabela 10	Imunorreatividade da ciclina D1 segundo variáveis clínico-demográficas nos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	54
Tabela 11	Imunorreatividade da Ciclina D1 segundo variáveis anatomopatológicas em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	55
Tabela 12	Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise p até 0,20.	56

Tabela 13	Variáveis independentes relacionadas com a expressão da ciclina D1 em 333 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.	56
Tabela 14	<i>Status</i> linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	57
Tabela 15	<i>Status</i> linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunohistoquímica dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	58
Tabela 16	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise p até 0,20.	59
Tabela 17	Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal em 333 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.	60
Tabela 18	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos, de acordo com variáveis clínicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	61
Tabela 19	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	62
Tabela 20	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos, de acordo com a expressão imunohistoquímica da ciclina D1, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	62
Tabela 21	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.	63
Tabela 22	Risco de recorrência de doença em pacientes portadores de carcinoma peniano em 333 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.	64

Tabela 23	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 e em 10 anos, de acordo com variáveis clínicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	66
Tabela 24	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 e em 10 anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	67
Tabela 25	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 e em 10 anos, de acordo com a imunorreatividade imunohistoquímica da ciclina D1, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	68
Tabela 26	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.	68
Tabela 27	Risco de óbito em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.	69
Tabela 28	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos, de acordo com variáveis clínicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	71
Tabela 29	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	72
Tabela 30	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específico em 5 anos, de acordo com a expressão imunohistoquímica da Ciclina D1, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.	72
Tabela 31	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.	73
Tabela 32	Risco de óbito por câncer em pacientes portadores de carcinoma peniano em 333 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

CEC	Carcinoma Espinocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HE	hematoxilina -eosina
HPV	Papiloma Vírus Humano
IMQ	Imunoistoquímica
LS	Linfonodo Sentinela
RNA	Ácido ribonucleico
TMA	Tissue Microarray

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Etiologia	3
1.3	Aspectos clínicos	5
1.4	Diagnóstico e avaliação linfonodal	8
1.5	Estadiamento	9
1.6	Aspectos terapêuticos	11
1.7	Variáveis prognósticas	14
1.8	Ciclo celular	19
1.9	Regulação do ciclo celular	20
1.10	Ciclina D1	23
1.11	Técnica de <i>tissue microarray</i>	27
2	OBJETIVOS	29
3	POPULAÇÃO E MÉTODOS	30
3.1	População de estudo	30
3.1.1	Critérios de inclusão	30
3.1.2	Critérios de exclusão	31
3.2	Metodologia	31
3.2.1	Diagnóstico	32
3.2.2	Estadiamento	32
3.2.3	Procedimento cirúrgico	33
3.2.4	Seguimento dos pacientes	33
3.2.5	Exame anatomopatológico do tumor primário	34
3.2.6	Confecção do <i>tissue microarray</i>	36
3.2.7	Técnica de imunohistoquímica	37
3.3	Casuística	40

3.3.1	Aspectos imunoistoquímicos	40
3.3.2	Aspectos epidemiológicos e clínicos	40
3.3.3	Aspectos anatomopatológicos	42
3.3.4	Aspectos cirúrgicos	44
3.4	Análise estatística	49
3.5	Análise de risco e aspectos éticos	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Imunohistoquímica da ciclina D1	53
4.1.1	Análise univariada	53
4.2	Avaliação do risco de metástases linfonodais	57
4.2.1	Análise univariada	57
4.2.2	Análise multivariada	59
4.3	Análise de sobrevida	60
4.3.1	Sobrevida livre de doença	60
4.3.2	Sobrevida global	64
4.3.3	Sobrevida câncer específica	69
5	DISCUSSÃO	75
5.1	Aspectos gerais	75
5.2	Aspectos imunoistoquímicos	83
5.3	Análise da sobrevida	89
6	CONCLUSÕES	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

ANEXO

Anexo 1 Ficha de Levantamento de Dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O carcinoma espinocelular (CEC) do pênis é responsável por aproximadamente 95% das neoplasias malignas deste órgão (SCHELLHAMMER et al. 1992), sendo outros 5% representados por outros tipos histológicos como carcinoma verrucoso, basocelular, melanoma e sarcoma (JOHNSON et al. 1973; ANTONELI et al. 1998).

Rara em países desenvolvidos correspondendo à 0,4 - 0,6% das neoplasias malignas no sexo masculino (GLOECKLER-RIES et al. 1990), chegando no entanto, entre 10-20% em alguns países da Ásia, África e América do Sul (RIVEROS e LEBRON 1963; RAJU et al. 1985; ROTOLO e LYNCH 1991).

Mundialmente, a maior incidência desta neoplasia é encontrada nas regiões de Barshi, Paranda e Bhum, na Índia, com taxa de 3,32 casos/100.000 hab. e as menores, entre os judeus nascidos em Israel, nos E.U.A e na Europa com taxas respectivamente de 0 caso/100.000 hab, 0,7 caso/100.000 hab e 0,09 caso/100.000 hab.

No Brasil dentre as neoplasias malignas no homem, o câncer de pênis representa aproximadamente 2,1% (BRUMINI 1982), sendo mais freqüente nos estados das regiões Norte-Nordeste (5,3 e 5,7% respectivamente), principalmente devido às más condições sócio-

econômicas da população (BRUMINI 1982). O estudo intitulado “Dados dos registros de base populacional-2003” vem corroborar esta estatística quando reporta índices mais atualizados, utilizando taxas de frequência relativa/100.000 hab., mostrando uma maior frequência nas regiões Norte-Nordeste com 0,62-1,52 casos/100.000 hab. em relação às regiões Sul-Sudeste com 0,32-0,80 casos/100.000 hab. O estado de São Paulo é o de maior prevalência com aproximadamente 22% dos casos, seguido por Maranhão e Rio de Janeiro com 12,5 e 12%, respectivamente (NARDI et al 2007).

Apesar de ser uma neoplasia preferencialmente de idosos, a idade pode variar entre 22-90 anos (DERRICK et al. 1973; BURGERS et al. 1992). Nos Estados Unidos, 22% têm o diagnóstico abaixo dos 40 anos e apenas 7% abaixo dos 30 anos. A média de idade no Brasil varia dos 50-53 anos (LOPES et al. 1996b; GUIMARÃES et al. 2006; CAMPOS et al. 2006). Diagnóstico em criança é raro, com poucos relatos na literatura (CUNHA et al. 1981; NARASIMHARAO et al. 1985).

A incidência do carcinoma de pênis varia consideravelmente com aspectos culturais, religiosos e principalmente, condições sócio-econômicas.

O paciente com baixo padrão sócio-econômico, que seja portador de fimose e tenha más condições de higiene, apresenta potencialmente um risco aumentado no desenvolvimento do câncer de pênis (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; BRINTON et al. 1991). O acesso a água encanada representa um dado isolado de extrema importância no que se refere à condições de higiene, diminuindo a incidência do câncer de pênis de 1,15

para 0,82 caso/100.000 hab., como foi demonstrado , por exemplo, na Dinamarca por FRISCH et al. 1995.

Por outro lado, a circuncisão tem um papel protetor na incidência deste carcinoma, seja esta realizada por motivos culturais ou religiosos. Importância deve ser dada não só ao momento de realização da mesma, mas também à idade do paciente na época da cirurgia. Nos judeus postectomizados logo após o nascimento a incidência referida em alguns trabalhos é nula, enquanto os hindus não operados a incidência pode chegar à 3,1% (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; LOPES et al. 1993).

A raça em estudos mais antigos, mostrava uma maior incidência no negro em relação ao branco. Em estudos mais recentes, este dado não se confirma, quando se compara homens de níveis sociais semelhantes (VATANASAPT et al. 1995).

1.2 ETIOLOGIA

A etiologia do câncer de pênis permanece indeterminada. Importante na avaliação desse carcinoma são os fatores associados à doença. Por exemplo, câncer de pênis e circuncisão. Vários estudos comprovaram esta associação com relatos de incidência de 3,3% nos indivíduos não circuncidados, e 0% naqueles submetidos à cirurgia ao nascimento (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967), demonstrando que a circuncisão é um importante fator de proteção. MADEN et al. (1993), encontraram risco de

3,2 vezes maior entre homens nunca circuncidados em relação àqueles circuncidados ao nascimento, e 3 vezes maior em relação àqueles circuncidados após o período neonatal.

Fatores de risco mais importantes são a presença de fimose, as baixas condições sócio-econômicas e as condições de higiene. A associação entre o câncer de pênis e a fimose pode resultar do esmegma, substância que é resultante da descamação das células epiteliais da face interna do prepúcio e que tem sido sugerido como agente carcinogênico dentro da cavidade prepucial fechada, a partir da conversão de esteróis esmegmáticos em esteróis carcinogênicos pela *Micobacterium smegmatic*, presente no esmegma (SHABAD 1964; RAJU et al. 1985). Porém, teste experimental sobre o papel do esmegma tem obtido resultados conflitantes (FISHMAN et al. 1942; DENNIS et al. 1956).

A infecção pelo vírus do HPV tem sido implicado na gênese do carcinoma peniano, tanto em estudos clínicos (BRINTON et al. 1991), quanto em estudos experimentais utilizando o genoma viral e o DNA da célula peniana (ROSEMBERG et al. 1991). A infecção é transmitida na maior parte das vezes durante o contato sexual, sem o uso do preservativo, por acesso direto das partículas virais às células basais através de pequenos traumas ou soluções de continuidade (BROKER 1987).

Apesar do vírus apresentar mais de 100 subtipos, o HPV 16 é identificado em aproximadamente 80-90% das neoplasias malignas do pênis positivas para a infecção, enquanto o HPV 18 é encontrado em cerca de 10% dos casos (CUPP et al. 1995). No Brasil, uma análise com 82 pacientes

relatou a presença do DNA-HPV em 30,5% dos casos, sendo 52% do tipo 16 e 16% do tipo 18 (BEZERRA et al. 2001).

Apesar de se identificar uma taxa considerável de infecção pelo HPV no câncer peniano, variando de 31-63% (WIENER et al. 1992), não se pode atribuir que o vírus do HPV seja uma causa do carcinoma peniano, mas um fator associado importante e prevalente. A infecção pelo HPV é considerada, em muitas regiões pobres, inclusive no Brasil, uma doença epidêmica. E como está associada aos carcinomas de vulva, colo de útero e pênis, estudos foram realizados e atualmente, já se encontram disponível no mercado, duas vacinas eficazes contra o vírus e em uso na prática clínica, fazendo parte de protocolos bem estabelecidos no controle e combate ao câncer nesses órgãos (DILLNER et al. 2007).

A associação do tabaco e carcinoma peniano vem se tornando mais evidente em estudos epidemiológicos realizados ao longo do tempo (HELLBERG et al. 1987; MADEN et al. 1993; HARISH e RAVI 1995), concretizando ainda mais, a hipótese de que o fumo causa câncer em todo epitélio escamo-celular, independente do contato direto da droga com o tecido.

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

Na avaliação clínica do paciente com suspeita de câncer de pênis, deve ser lembrado que existe um perfil epidemiológico do indivíduo acometido, alertando o profissional para o diagnóstico mais precoce e

correto da doença. Na maioria das vezes, ocorre em homens de baixo nível sócio-econômico, más condições de higiene e com presença de fimose, que demorou a procurar assistência médica especializada, muitas vezes por vergonha ou medo, ou principalmente, por dificuldade de acesso ao serviço médico em cidades pobres e pequenas do interior do Brasil ou nos países subdesenvolvidos da Ásia, África e Américas do Sul e Central. Essa demora pode levar de 6-24 meses (BUDDINGTON et al. 1963; LOPES et al. 1994), prejudicando não só o tratamento, mas principalmente o prognóstico desse doente.

O carcinoma de pênis apresenta-se como tumor exófito ou infiltrativo, na grande maioria dos casos. Geralmente relatado pelos pacientes como “ferida no pênis”, podendo vir como sinal isolado ou em associação com outros sintomas como: dor, inflamação, disúria, prurido e hemorragia. Mais comumente a lesão é encontrada na glândula em 48% dos casos, prepúcio em 21%, em ambas as áreas em até 9% e sulco coronal em 6% dos casos (SUFRIN e HUBEN 1987).

Quando não tratado nesta fase, evolui infiltrando tecidos adjacentes e dissemina por via linfática, apresentando metástases regionais, preferencialmente para os linfonodos inguinais e depois, para os ilíacos (NARAYANA et al. 1982; PERSKY e DEKERNION 1986). Metástases por via hematogênica são raras, variando entre 1-10% (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978).

O exame físico consiste numa cuidadosa palpação e caracterização da lesão peniana em relação a sua forma e aspecto, localização, tamanho,

consistência, mobilidade e sintomas associados. A presença de fimose deve ser apontada, assim como de lesões verrucosas presentes não só no pênis, mas em toda região ano-genital. Posteriormente, a palpação meticulosa das regiões inguinais a procura de linfonodos aumentados, bilateralmente, é fundamental devido aos altos índices de falso negativo e falso positivo. A caracterização detalhada dessas adenomegalias, se existir, são de extrema importância.

A propedêutica armada, com o uso da ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética, antigamente questionada por apresentar baixa sensibilidade e especificidade na detecção das metástases linfonodais (HORENBLAS et al. 1991; BURGERS et al. 1992). Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico, passa a ser utilizada de rotina em centros especializados e com protocolos bem estabelecidos, geralmente em países desenvolvidos, ajudando não só no diagnóstico precoce, mas no tratamento, possibilitando cirurgias menos agressivas, com melhor qualidade de vida para o paciente (KAYES et al. 2007), e principalmente no prognóstico, ajudando junto com outras ferramentas, a selecionar com maior critério pacientes submetidos à linfadenectomia radical, diminuindo assim, morbi-mortalidade e aumentando a curabilidade da doença.

As metástases linfonodais quando não tratadas, invadem o feixe vâsculo-nervoso dos grandes vasos, levando os pacientes à morte num período de até 2 anos, por sepsis e/ou hemorragias vultuosas por ruptura

vascular (BEGGS e SPRATT 1964; DERRICK et al. 1973). Não existem relatos de remissão espontânea.

1.4 DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO LINFONODAL

O diagnóstico definitivo é realizado a partir da biópsia da lesão peniana suspeita, buscando biopsiar a periferia da lesão, evitando áreas necro-hemorrágicas e quando possível, obtendo fragmentos do tecido normal. Pode ser incisional ou excisional naqueles tumores pequenos (LOPES et al. 1994). Não existem relatos de efeitos danosos como disseminação do tumor após biópsia da lesão (EKSTROM e EDSMYR 1958).

Devido à baixa acurácia dos métodos diagnósticos na avaliação dos linfonodos inguinais, sejam estes, clínicos ou de imagem, muitos autores passaram a estudar novas formas de avaliação desses linfonodos regionais e com isso, diminuir a morbidade da linfadenectomia radical clássica.

Na tentativa de melhorar a acurácia da avaliação linfonodal, a punção por agulha fina dos linfonodos suspeitos pode ser realizada, porém valorizando apenas os resultados positivos, pela baixa sensibilidade do método (HORENBLAS et al. 1991; BURGERS et al. 1992).

Utilizando a linfocintilografia a partir do linfático principal no dorso peniano, foi identificado e denominado de linfonodo sentinela (LS), o primeiro sítio de disseminação da doença (CABANAS 1977), segundo o mesmo, a biópsia do LS, definiria melhor o estadiamento e a conduta, já que

a linfadenectomia radical seria evitada nos casos de LS negativo. No entanto, posteriormente, houve relatos em outros estudos, do desenvolvimento de metástases linfonodais em pacientes cujo LS foi negativo, e assim questionado o real valor do método (PERINETTI et al. 1980; WESPER et al. 1986).

Mais recentemente, HORENBLAS et al. (2000), utilizando a linfocitilografia pré-operatória com dextram marcado com tecnécio sob auxílio de um gama-probe no intra-operatório, rastreamos os possíveis sítios linfonodais de disseminação metastática, obtendo alto índice de acerto. Porém, dois anos após, a partir da avaliação de 90 pacientes com câncer de pênis, utilizando o mesmo método de rastreamento, foi relatado um índice de falso negativo de 22%, com sensibilidade de 80%, deixando dúvidas sobre a eficiência do método (TANIS et al. 2002).

1.5 ESTADIAMENTO

O estadiamento de qualquer neoplasia consiste na avaliação da extensão da doença do ponto de vista local, regional e à distância. É uma etapa imprescindível para o prognóstico e para a definição da melhor conduta à ser instituída.

O estadiamento mais utilizado foi proposto por JACKSON (1966), o qual classificava a doença em 4 estádios clínicos:

- I- Tumor limitado à glândula e prepúcio.

- II- Tumor invaindo o corpo peniano.
- III- Tumor com metástases inguinais, porém ressecáveis.
- IV- Tumor invadindo estruturas adjacentes e/ou tumor associado com metástases inguinais irressecáveis e/ou metástases à distância.

Entretanto, ao longo dos anos, esta classificação se mostrou falha, pois era basicamente clínica, não detalhando características importantes do tumor primário e das metástases como: tamanho, extensão da infiltração do tumor primário e das metástases, número e localização dos linfonodos comprometidos, além do grau de diferenciação do tumor (SCHELLHAMMER et al. 1992).

Mais recentemente, um novo sistema de classificação, passou a ser utilizado. O mesmo leva em consideração o tamanho do tumor e/ou seu grau de infiltração em profundidade (T), a situação linfonodal das regiões inguinais (N) e a presença ou ausência de metástases (M)—Sistema TNM, da União Internacional Contra o Câncer (UICC-2002). À esta última classificação, foi incorporada parâmetros histopatológicos do tumor primário e dos linfonodos, como infiltração de corpos cavernosos, uretra, metástases em um ou mais linfonodos inguinais e metástase em linfonodos pélvicos (HERMANEK e SOBIN 1987).

1.6 ASPECTOS TERAPÊUTICOS

O padrão ouro no tratamento definitivo para o câncer de pênis, ainda é baseado na ressecção cirúrgica da lesão peniana primária com margem de segurança, seguida de linfadenectomia inguinal e/ou ínguino-ílica radical clássica, sempre bilateral o mais precoce possível, quando indicada (CATALONA 1980; MOHS et al. 1985; HORENBLAS et al. 1991; LOPES et al. 1996b).

Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico e o aperfeiçoamento de novas técnicas, cada vez menos invasivas, em prol do efeito cosmético, melhor qualidade de vida e reintegração biopsíquica do paciente, preservando sempre, a eficiência do tratamento e a cura do tumor, as lesões pequenas, em estádios iniciais, podem ser tratadas de forma conservadora (LONT et al. 2006), seja por radioterapia, laserterapia (MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007), ou até ressecções regradas, com excisão local da lesão, respeitando com rigor as margens de segurança (MOHS et al. 1992). Entretanto, necessitam de protocolos bem definidos e indicações criteriosas, além de um acompanhamento rigoroso no pós-operatório, pois os índices de recidiva, sejam locais ou regionais são aumentados (ODLAND 1997; LONT et al. 2006).

Apesar do impacto mutilante, a amputação parcial ou total do pênis são na prática clínica, as cirurgias mais realizadas no tratamento do carcinoma peniano, mesmo porque, na maioria dos casos o diagnóstico do tumor é feito tardiamente, já em estágio avançado. Amputações parciais

devem apresentar margem entre 1,5-2,0cm do tumor. Somente com margens adequadas, as taxas de recidivas locais são baixas (DEKERNION et al. 1973). Lesões que infiltrem a base do pênis ou em tumores extensos, com coto peniano inadequado, geralmente menores que 4,0 cm, as amputações totais com uretostomia perineal são mais adequadas (DAS 1992).

A outra etapa fundamental na cura do câncer de pênis, é a abordagem terapêutica dos linfonodos regionais, com o índice de cura pós linfadenectomia variando de 30-70%. Entretanto, quando não tratados, o óbito ocorre em geral dentro de dois anos (DEKERNION et al. 1973; CATALONA 1980; POMPEU 1993). A sobrevida do doente é inversamente proporcional ao número de linfonodos acometidos. Várias séries reportaram sobrevidas favoráveis em indivíduos com baixas taxas de acometimento linfonodal pós linfadenectomia (SRINIVAS et al. 1987; FRALEY et al. 1989; ORNELLAS et al. 1994). Apesar da baixa acurácia dos métodos outrora utilizados na avaliação linfonodal (SUFRIN e HUBEN 1987) e da alta morbidade da linfadenectomia (HERR 1992; LOPES et al. 1996b), a seleção dos pacientes deve ser criteriosa (BEGGS e SPRATT 1964; KAMAT et al. 1993; COBLENTZ e THEODORESCU 2002), pois é a última e única chance de cura do doente.

Muitos protocolos advogam o uso do antibiótico por 2-6 semanas pós tratamento do tumor primário do pênis, não só para um maior controle da infecção subjacente ao tumor, já que a linfadenopatia inflamatória é um diagnóstico diferencial importante, mas também, pela redução da morbidade

operatório relacionada com a linfadenectomia inguinal posterior (ROTOLO e LYNCH 1991, SCHELLHAMMER et al. 1992).

Existe uma polêmica entre a realização de linfadenectomias terapêuticas ou profiláticas. Alguns estudos mostram que a realização das primeiras propicia uma sobrevida semelhante quando da realização das últimas (EKSTROM e EDSMYR 1958; BEGGS e SPRATT 1964), entretanto, estudos mais recentes não confirmam estes achados, mostrando índices de sobrevidas infinitamente superiores quando realizadas profilaticamente em comparação com as terapêuticas, principalmente nos T2 e T3 (MCDOUGAL et al. 1986; FRALEY et al. 1989). Finalmente, a tendência atual é realizar linfadenectomias profiláticas nos tumores com estágio T2 e T3. A forma de realização da linfadenectomia também é variável (CATALONA 1988).

Atualmente, a cirurgia laparoscópica, já utilizada na dissecação linfática pélvica desde 1990 (SCHUESSLER et al. 1991), vem trazendo contribuições importantes não só na linfadenectomia pélvica, mas também na linfadenectomia inguinal nos pacientes com carcinoma de pênis (MACHADO et al. 2005). Apresentando resultados iniciais favoráveis: menor morbidade, menor permanência hospitalar, número de linfonodos ressecados satisfatórios, recuperação pós-operatória melhor e mais rápida (TOBIAS-MACHADO et al. 2007). Contudo, ainda sem um seguimento adequado e portanto, ainda longe de ser padrão-ouro na linfadenectomia inguinal.

A lateralidade da linfadenetomia é definida pela drenagem linfonodal do órgão, que é do tipo cruzada, assim, a linfadenectomia bilateral deve ser sempre o padrão, já que o risco de metástases contralaterais é de até 30%

(SRINIVAS et al. 1987; LOPES et al. 1996b). Por outro lado, a linfadenectomia pélvica, só deve ser realizada quando da positividade dos linfonodos inguinais, pois de 15-30%, a disseminação pélvica é encontrada (PURAS et al. 1978; SRINIVAS et al. 1987). A disseminação linfática exclusiva para os linfonodos pélvicos é bastante rara (ABI-AAD e DEKERNION 1992).

1.7 VARIÁVEIS PROGNÓSTICAS

A presença de metástases linfonodais é o principal fator de prognóstico no carcinoma de pênis, (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977), prevalecendo como consenso em estudos mais recentes (NARAYANA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; POMPEU 1993; HORENBALS et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996b).

Corroborando este consenso, SUFRIN e HUBEN (1987), obtiveram 27,5% e 66,2% de sobrevida em 5 anos, dos pacientes com e sem metástases linfonodais, respectivamente. SRINIVAS et al. (1987) apresentaram índices de 28% para aqueles com metástases e de 74% para os sem metástases, também em relação à sobrevida em 5 anos.

Ao longo dos anos, inúmeros autores tentaram correlacionar fatores clínicos e/ou patológicos com comprometimento linfonodal pelo carcinoma peniano, buscando escores cada vez mais específicos, proporcionando uma seleção correta dos pacientes com melhor ou pior prognóstico e, a partir daí,

uma abordagem eficaz com o mínimo de morbi-mortalidade e o máximo de curabilidade da doença.

Alguns autores correlacionaram a extensão do comprometimento linfonodal com o prognóstico, sugerindo até, algumas classificações como a que dividia o status linfonodal em N1- Apenas 1 linfonodo comprometido; N2- 2-6 linfonodos comprometidos; N3- >6 linfonodos, sendo N3a- Unilateral e N3b- Bilateral. N4- Comprometimento extra-nodal (SRINIVAS et al. 1987). Neste mesmo estudo, foi relatada sobrevida em 5 anos de 50-80% nos casos de N1e N2 e de 4-12% nos casos de N3 e N4. HORENBLAS et al. (1993), observaram que pacientes com mais de 2 linfonodos inguinais metastáticos, apresentavam não só, maior incidência de metástases linfonodais contralaterais e pélvicas, mas também, maior índice de óbito pela doença. Estudos mais recentes, também obtiveram uma correlação diretamente proporcional do número de linfonodos com o aumento da taxa de óbito pela doença (LOPES et al. 2000).

Quando da correlação de fatores clínicos e histológicos do tumor primário com o prognóstico do carcinoma peniano, SOLSONA et al. (1992), correlacionando o sítio do tumor com o prognóstico da doença, observaram que 64,3% dos pacientes com invasão de corpo cavernoso apresentaram metástases linfonodais, diferentemente daqueles sem invasão com apenas 4,2% de metástases. Posteriormente, a partir de uma análise prospectiva, o mesmo autor demonstrou que no estágio T1 havia 11% de comprometimento linfonodal contra 63% no estágio T2 e T3 (SOLSONA et al. 2001).

LOPES et al. (1996b), avaliando espessura tumoral e presença de embolização vascular e linfática de células tumorais, observaram que tumores com profundidade maiores que 5mm, apresentavam um número maior de metástases linfonodais em comparação aos tumores mais superficiais, e que a embolização tanto vascular quanto linfática é fator preditivo para metástase linfonodal, fato este, também observado por FRALEY et al. 1989; SLATON et al. 2001; GUIMARÃES et al. 2006).

O grau de diferenciação do tumor é outro aspecto aventado por muitos autores como preditor, não somente de comprometimento linfonodal, mas também de sobrevida global (POMPEU 1993; SLATON et al. 2001). FRALEY et al. 1985, ratificaram esta afirmativa, quando observaram que pacientes com tumores pouco diferenciados, apresentam mais metástases linfonodais e menor sobrevida quando comparadas às lesões mais diferenciadas. SOLSONA et al. (2001), relatou risco de metástases linfonodais de 15% para os tumores de grau 1, 67% para o grau 2 e até, 75% para o grau 3.

GUIMARÃES et al. (2006), avaliaram o tipo de invasão patológica do tumor espinocelular do pênis (baseada em padrões histológicos de tumores de outros órgãos em seres humanos), e procuraram correlacioná-la ao comprometimento linfonodal. Observaram uma significância estatística para o tipo *infiltration* com 65% de metástase linfonodal em comparação ao tipo *pushing infiltration* com apenas 23% de metástase nos linfonodos.

FICARRA et al. (2006), desenvolveram um nomograma baseado no estágio clínico dos linfonodos inguinais e nos achados patológicos dos

tumores primários tratados que pudesse estimar o risco de desenvolvimento de metástases nos linfonodos e assim, tivesse o papel de selecionar com maior critério quais os pacientes que realmente se beneficiariam com a linfadenectomia radical em relação ao prognóstico e sobrevida, independente da morbi-mortalidade intrínseca do procedimento. Os fatores de maior risco para o desenvolvimento de metástase linfonodal foram em ordem decrescente: embolização vascular e/ou linfática; presença clínica de linfonodomegalia; grau histológico do tumor; tipo de crescimento tumoral e infiltração de corpo esponjoso; invasão de corpo cavernoso; infiltração de uretra; espessura do tumor. Esses fatores somados dão o escore do paciente. Quanto maior a pontuação, maior o risco de metástases linfonodais.

KATTAN et al. (2006), aperfeiçoando este nomograma, criou um segundo nomograma baseado desta vez, nos achados patológicos pós amputação e pós linfadenectomia. Observaram que a espessura tumoral, nesse novo nomograma representa um risco bem aumentado de desenvolvimento de metástases linfonodais quando comparado ao nomograma anterior. O risco na infiltração cavernosa suplantou o da infiltração esponjosa em relação também ao nomograma anterior, e o risco diminuiu entretanto, quando o fator analisado foi tipo de crescimento tumoral (vertical ou superficial).

O HPV, infecção associada ao carcinoma de pênis, também muito estudado como fator correlacionado ao comprometimento linfonodal, não demonstrou influência estatisticamente significativa, quando da presença

isolada do DNA-HPV, em relação ao aumento da incidência de metástases linfonodais (VILLA e LOPES 1986; BEZERRA et al. 2001), por outro lado, a associação da presença do DNA-HPV com o aumento da expressão do p53 são relacionadas à um pior prognóstico da doença (LOPES et al. 2002).

Contudo, apesar de todos esses estudos tentarem correlacionar os fatores clínicos e/ou anátomo-patológicos, não existe ainda uma precisão incontestável no estadiamento do tumor. Com o aperfeiçoamento de técnicas de anatomia patológica e o desenvolvimento tecnológico, passou-se a se estudar fatores bio-moleculares preditores de prognóstico, buscando assim, ampliar as ferramentas disponíveis para o melhor estadiamento e seleção de pacientes.

LOPES et al. (2002), a partir de um estudo de 82 pacientes com carcinoma peniano, demonstraram que a hiperexpressão do p53 estava associada à uma alta incidência de metástases linfonodais tanto na análise univariada quanto na multivariada.

A partir do estudo da Prostaglandina E2 (PGE2) e Ciclooxygenase (COX) em carcinoma peniano, foi observado uma expressão aumentada de ambos bio-marcadores tanto através da imunoistoquímica quanto pela técnica do *western blotting* somente em células tumorais, sem crescimento dos mesmos, em tecido normal do pênis (GOLIJANIN et al. 2004).

CAMPOS et al. (2006), avaliaram através da técnica de imunoistoquímica, a caderina-E (E-caderina); metaloproteinase 2(MMP-2) e metaloproteinase 9(MMP-9) como fatores prognósticos no câncer peniano, relatando uma associação significativa da baixa expressão da caderina-E

com metástases linfonodais. Em relação à recorrência da doença, a expressão da MMP-9 se mostrou como fator independente de risco.

SOARES et al. (2006), confrontando os três tipos de crescimento e invasão do carcinoma peniano com a expressão imunoistoquímica das metaloproteinases dos tipos 2 e 9, obtiveram uma associação interessante entre a expressão aumentada das metaloproteinases 2 e 9 com um padrão de invasividade maior, principalmente naqueles tumores com pouca diferenciação histológica.

GUIMARÃES et al. (2007) questionaram o valor prognóstico do PCNA e do MIB-1/KI-67 no CEC de pênis, após estudo prévio do mesmo autor em 2003.

1.8 CICLO CELULAR

Durante muito tempo, a mitose e a citocinese foram eventos muito apreciados através da microscopia ótica no ciclo celular, apesar de constituírem em conjunto um evento breve, chamado de fase M. Por outro lado, a fase de transição entre as mitoses chamada de interfase apresenta-se como um evento mais demorado e homogêneo. Este último quando analisado com técnicas mais novas, é constituído de uma série de eventos ordenados e muito bem regulados com um único objetivo: preparar a célula para o período de divisão celular (MURRAY et al. 1994). Então, o ciclo celular de uma célula eucariótica é dividido em 2 fases: interfase (G1-*gap1*, S -síntese e G2 – *gap2*) e M (mitose). Na fase G1 inicia-se a produção de

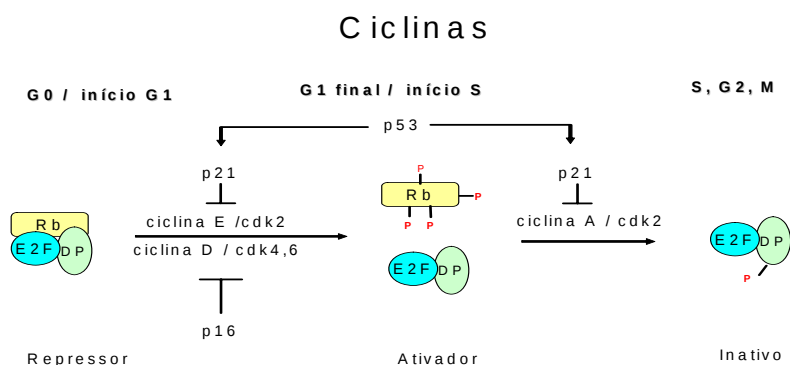
proteínas que se estende por toda interfase, inicialmente com a síntese de RNA, preparando a célula para a duplicação do material genético. Nesta fase existe ainda um importante *checkpoint*, no qual existe toda uma checagem do processo de síntese protéica, sinalizando para a célula três possíveis caminhos: continuar o ciclo; interromper ciclo ou sair do ciclo. Na fase S ocorre a duplicação do material genético (DNA) propriamente dito, e a fase G2 consiste na preparação para mitose (M). Nesta última, há a duplicação celular propriamente dita e produção de duas células-filhas (LEWIN 2001; KNOOP et al. 2005). Após o término do ciclo celular, a célula pode novamente entrar em divisão ou iniciar a fase G0 (fase de repouso).

1.9 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

O ciclo celular é regulado pelas ciclinas, quinase dependentes de ciclinas (cdk's) e inibidores ciclinoquinase dependentes (*cki's*). As ciclinas, descobertas em 1983 por Richard Timothy Hunt, são proteínas que agem como subunidades reguladoras das cdk's as quais são proteínas catalíticas que fosforilam proteínas alvo durante o ciclo celular (LEWIN 2001; RUDOLPH et al. 2003; KOLJONEN et al. 2004). Com o estudo das ciclinas, avanços no conhecimento molecular de vários tipos de cânceres em humanos foram alcançados. Todas as ciclinas contém um domínio utilizado para ligação e ativação das *cdks*, formando assim, um complexo ciclina-cdk. As ciclinas não têm somente a função de regular o ciclo celular, atuam juntamente com seus complexos de *cdks* respectivos na regulação da

transcrição, reparo de DNA, diferenciação e apoptose (JOHNSON e WALKER 1999).

As ciclinas do tipo D, induzem células na fase G0, estimulando-as a entrar na fase G1, iniciando o ciclo celular. As ciclinas D1, D2 e D3, formam complexos com as cdk4 e cdk6 ativando-as para que as mesmas possam atuar em proteínas alvo (ex: proteína retinoblastoma -pRb) (KNOPP et al. 2005). Para a célula transpor da fase G1 para a fase S, a fosforilação da pRb é essencial para a liberação do fator de transcrição E2F (LEWIN 2001; GRADISHAR 2005). Com isso o complexo ciclina/cdk atuará sobre E2F/pRb fosforilando a proteína retinoblastoma em sítios específicos, o que resultará no desligamento deste complexo, liberando E2F o qual pode, então, ativar a transcrição dos genes cujas funções são necessárias para fase S, como por exemplo ativação do gene que codifica a ciclina E. A ciclina E atua no final da fase G1 formando complexo com cdk2 o qual regula a função de várias proteínas alvo. É nesta fase que a ciclina E/cdk2 associada ao complexo E2F/p107 ativa a expressão da ciclina A. A ciclina A forma complexo com cdk2 iniciando a duplicação do DNA (fase S) e com cdc2 na transição da fase G2 para fase M (Figura 1).



Fonte: JOHNSON e WALKER (1999)

Figura 1 - Regulação da atividade transcricional do E2F através do ciclo celular.

A ciclina B atua na transição da fase G2 para M mediante a defosforilação de cdc25, o qual ativa o complexo ciclinaB/cdc2, necessário para a progressão da fase G2 para M, havendo assim a duplicação celular (LEWIN 2001).

As ciclinas foram originalmente denominadas em função da sua propriedade em acumular de forma contínua ao longo do ciclo celular. Então, elas são destruídas ao final da fase M por proteólise (LEWIN 2001).

Atribui-se à desregulação do controle do ciclo celular normal a patogênese da maioria dos cânceres em humanos. A expressão anormal de proteínas reguladoras que controlam a transição da fase G1 para fase S, fator limitante para a progressão do ciclo celular, é frequentemente observada. Estudos sobre ciclinas estão sendo realizados com objetivo de buscar correlação da expressão destas proteínas com a patogênese dos tumores malignos em humanos (BALI et al. 2004; KOLJONEN et al. 2004; KNOPP et al. 2005).

1.10 CICLINA D1

A ciclina D1, uma das ciclinas mais estudadas, apresenta correlações importantes na patogênese molecular de vários tipos de cânceres em humanos.

Vários estudos, utilizando a técnica de imunoistoquímica, foram realizados objetivando analisar a expressão anormal dos produtos do gene da ciclina D1 nos vários tipos histológicos do câncer epitelial de ovário (seroso, endometrióide, mucinoso e carcinoma de células claras). Existem fortes evidências que a expressão aumentada da ciclina D1 está presente nas células tumorais ovarianas, o que não é observada em células normais de ovário (HUNG et al. 1996; WORSLEY et al. 1997; DHAR et al. 1999; CHEN et al. 2005), porém sem diferença estatística entre os tipos histológicos deste tumor. Foi verificado que a expressão desta ciclina foi aumentada basicamente em tumores de grau 1 e 2, e naqueles bem diferenciados (MASCIULLO et al. 1997). Foram também encontradas evidências de aumento da expressão da ciclina D1 no tipo mucinoso e de células claras (SUI et al. 1999).

BARBIERI et al. (1999), utilizando a técnica de *Western Blot*, observou aumento da expressão de ciclina D1 somente no tipo histológico seroso, pouco diferenciado e em estágio avançado.

Apesar das conclusões dos diferentes estudos realizados sobre a expressão da ciclina D1 no câncer de ovário não serem uniformes, talvez pelas diferentes técnicas de análise utilizadas, ou talvez pelos diferentes

sistemas de escore utilizados, sabe-se que o gene da ciclina D1 está presente na tumorigênese do câncer de ovário (CHEN et al. 2005).

As ciclinas também foram estudadas no CEC de vulva, trazendo contribuições importantes na patogênese molecular deste tumor. Como o tratamento do carcinoma da vulva é geralmente mutilante, assim como o de câncer de pênis, levando à conseqüências físicas e psicológicas importantes, e principalmente com o aumento da prevalência deste tumor em mulheres cada vez mais jovens, estudos estão sendo realizados com o objetivo de individualizar o tratamento, reduzindo os efeitos negativos nas pacientes de melhor prognóstico. Os marcadores moleculares vêm para ajudar neste planejamento terapêutico, selecionando pacientes para serem submetidos a tratamentos menos radicais, sem, contudo aumentar a probabilidade de metástases. Assim, KNOOP et al. (2005), analisaram a expressão molecular da ciclina D1 na patogênese molecular do carcinoma de vulva, avaliando se esta poderia ser considerada um potencial marcador molecular para predição de prognóstico desta patologia. O estudo avaliou 224 mulheres com carcinoma vulvar num período de 14 anos, somente com tratamento cirúrgico, sem radioterapia e/ou quimioterapia pré-operatória. Foi observado que a ciclina D1 apresentou expressão baixa (nenhuma núcleo celular positivo) em 74% dos espécimes estudados, enquanto expressão alta (qualquer quantidade de núcleo celular positivo) em 26% dos espécimes estudados. A ciclina D1 apresentou correlação estatisticamente significativa com a expressão da proteína p16, p21 e p53. Os autores observaram neste estudo que a expressão da ciclina D1 em câncer de vulva é maior quando

comparada ao câncer de colo de útero. Este fato pode justificado pela ligação do vírus HPV, muito associado no câncer de colo, ao receptor da pRb diminuindo a expressão da ciclina D1 nesta patologia (KNOPP et al. 2005).

A ciclina D1 foi estudada também nos tumores endócrinos do pâncreas em humanos, sendo observada uma expressão anormal desta mesma ciclina em 43% (26/64 casos) dos casos estudados. Quando classificados quanto à porcentagem de positividade nuclear, observou-se que, dentre os 26 casos que expressaram a ciclina D1, 13 casos apresentaram menor que 25% da positividade nuclear; 7 casos apresentaram 25-50% de positividade nuclear e 6 casos apresentaram positividade nuclear maior que 50%. Tanto em casos iniciais quanto nos avançados houve expressão da ciclina D1 sem contudo, apresentar diferença estatística. Assim, sugere-se neste estudo que a ciclina D1 funciona como um oncogene envolvido na patogênese desses tumores (CHUNG et al. 2005).

Ainda tratando-se de câncer em pâncreas, com o objetivo de tentar explicar a quimiorresistência das células tumorais e utilizando uma determinada linhagem de célula pancreática cancerígena, foi estabelecida que a expressão aumentada da ciclina D1 determina resistência aos efeitos apoptóticos e inibitórios de crescimento, ocasionados pelo uso do quimioterápico cisplatina. Por outro lado, com a redução da expressão da ciclina D1, houve tanto um aumento da sensibilidade à cisplatina quanto um aumento da indução de apoptose. Em conclusão, o aumento da quimioresistência relacionada com a expressão aumentada da ciclina D1 foi

associada às suas duas funções primordiais: de promoção do crescimento celular e de inibição das drogas indutoras de apoptose (BILIRAN et al. 2005).

No grupo de tumores epidermóides de cabeça e pescoço, vários estudos demonstraram impacto adverso do gene da ciclina D1 no prognóstico do paciente. Estudo realizado em pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe, utilizando a técnica de imunoistoquímica, foi observado 66% de expressão aumentada da ciclina D1. Analisando a curva de sobrevida foi demonstrado que o aumento da expressão da ciclina D1 eleva a porcentagem de recorrência local do tumor, e por sua vez diminui tanto a sobrevida total, quanto a sobrevida livre de doença em cinco anos. Assim, a ciclina D1 apresentou-se como preditora significativa para os três fatores estudados. Em conclusão, a ciclina D1 é um preditor forte de prognóstico em pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe e por este motivo, pode definir estratégias terapêuticas como forma de melhorar a sobrevida, como também reduzir a recorrência nestes pacientes (YU et al. 2005).

Estudo desenvolvido com 48 pacientes diagnosticadas com carcinoma invasivo de mama através de biópsia, mostrou os seguintes resultados: 73% do grupo de pacientes estudadas, apresentou uma expressão moderada ou alta da ciclina D1, e quando analisadas utilizando a curva de sobrevida (Kaplan-Meier), mostrou não só um aumento na sobrevida global, mas também um aumento na sobrevida livre de doença. Pacientes que apresentaram positividade tanto para receptor de estrógeno

quanto para ciclina D1, tiveram melhor prognóstico. Pela análise univariada da ciclina D1 com parâmetros clínicos, constatou-se significância estatística inversamente proporcional da ciclina D1 com o grau e o tamanho do tumor. O estudo sugere a quantificação da ciclina D1 como método de rotina na avaliação diagnóstica do câncer de mama (BILALOVIC et al. 2005).

No carcinoma de pênis, existe apenas um estudo que analisa a ciclina D1 e o KI-67, tanto em casos de carcinoma peniano, quanto nos casos de lesões pré malignas de pênis (PAPADOPOULOS et al. 2007).

1.11 TÉCNICA DE *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

O estudo destes bio-marcadores com a técnica do TMA, permite a realização de painéis com múltiplos marcadores, sincronicamente e sob as mesmas condições operacionais. Possibilitando a análise de eventos concomitantes com mais rapidez, menor custo e maior uniformidade técnica, comparado com os métodos imunohistoquímicos habituais. Como os tecidos arquivados em parafina são de uso limitado para pesquisa, uma vantagem adicional do TMA é a maior preservação deste material arquivado em comparação com os métodos tradicionais (KONONNEN et al. 1998; RIMM et al. 2001).

Embora neste método o reduzido tamanho da amostra possa sugerir um risco de uma sub-avaliação, quando comparado os volume teciduais obtidos com esta técnica (0,6 mm em diâmetro; 0,282 mm² /amostra) vários artigos tem revelado valor prognóstico similar de estudos com o TMA em

comparação às técnicas habituais (CAMP et al. 2000; MUCCI et al. 2000; NOCITO et al. 2001). A confecção de mais de uma lâmina receptora com os mesmos casos (RIMM et al. 2001) e com amostras em duplicata em cada bloco receptor, permite confecção de duas a quatro amostras de cada caso, que submetidas a o mesmo marcador, eliminam este risco hipotético.

2 OBJETIVOS

- Estudar a expressão imunoistoquímica (IMQ) da ciclina D1 em CEC de pênis, utilizando a técnica do *tissue microarray*.
- Estudar o valor prognóstico da expressão IMQ da ciclina D1 em CEC de pênis.
- Correlacionar os achados de expressão IMQ de ciclina D1 em CEC de pênis com variáveis clínicas, demográficas e anatomopatológicas selecionadas tendo como estimadores de prognósticos a ocorrência de metástases linfonodais e as taxas de sobrevida livre de doença, sobrevida global e sobrevida câncer específica.

3 POPULAÇÃO E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos no estudo os pacientes admitidos na divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, no período de 1953 a 2004, com diagnóstico de CEC de pênis. A partir de uma amostra de 351 casos inicialmente selecionados, 333 pacientes foram habilitados para análise, seleção de blocos de parafina, revisão de lâminas histológicas, com o propósito de confirmação diagnóstica e principalmente, da realização do estudo imunoistoquímico dos mesmos.

3.1.1 Critérios de inclusão

- Pacientes portadores de CEC de pênis, submetidos a cirurgia do tumor primário e à linfadenectomia regional uni ou bilateral concomitantemente ao tratamento do tumor primário ou em qualquer momento do seguimento.
- Pacientes que não foram submetidos à linfadenectomia, porém com seguimento adequado, por pelo menos 5 anos.
- Pacientes que apresentam material arquivado em bloco de parafina suficiente para novos cortes histológicos e confirmação do diagnóstico.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes que apresentavam metástases à distância no momento do diagnóstico.
- Pacientes com segundo tumor primário no momento do diagnóstico.
- Pacientes que foram submetidos a quimioterapia e/ou radioterapia previamente ao tratamento cirúrgico do tumor primário do pênis.

3.2 METODOLOGIA

Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários médicos arquivados no SAME - Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente de São Paulo.

Os dados coletados foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida (Anexo 1).

Foi feita uma análise retrospectiva dos dados obtidos.

Posteriormente, foram coletados os respectivos materiais dos pacientes devidamente arquivados, em parafina, no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, que foram passíveis de confirmação diagnóstica.

As lâminas dos respectivos pacientes foram separadas e aquelas de má qualidade, desprezadas, sendo feitas novas lâminas com o material parafinado, previamente coletado, para a confirmação do diagnóstico e marcação da área tumoral. Dois patologistas (FAS; IWC), do departamento

de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, realizaram essa análise, sendo todo o material revisado por um terceiro patologista (AC) de outro serviço.

O material foi então, utilizado para a confecção do *tissue microarray* (TMA) e, posteriormente, para o estudo imunoistoquímico com a ciclina D1.

3.2.1 Diagnóstico

Todos os pacientes foram avaliados inicialmente por exame clínico geral, analisando-se os diversos aparelhos e sistemas, e exame locoregional, no qual a lesão primária era caracterizada segundo o seu aspecto, localização e extensão. A presença de linfonodos clinicamente metastáticos foi investigada através da palpação das regiões inguinais. O toque retal foi realizado para avaliação de possível infiltração da raiz do pênis e próstata.

A suspeita clínica foi confirmada sempre pela biópsia incisional da área periférica da lesão. O material de biópsia obtido foi fixado em formalina à 10% e incluído em parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina. Quando os pacientes já haviam sido biopsiados em outras instituições, as lâminas foram submetidas à revisão anatomopatológica sistemática.

3.2.2 Estadiamento

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema **TNM, UICC 2002**, onde se recomenda o agrupamento dos pacientes por estádios clínicos e se

considera linfonodos regionais aqueles localizados nas regiões inguinais. As metástases pulmonares foram investigadas através de radiografias de tórax realizadas nas incidências pósterio-anterior e perfil.

3.2.3 Procedimento cirúrgico

Todos os pacientes foram tratados por cirurgia. Os tumores foram excisados com margem macroscópica mínima de 2,0 cm. O tipo de cirurgia realizada variou de acordo com a extensão do tumor. Os procedimentos realizados foram ressecção ampla, amputação parcial ou total do pênis. No último caso, os pacientes foram submetidos a uretroplastia perineal.

O tratamento dos linfonodos regionais, quando necessário, foi à linfadenectomia inguinal ou ilioinguinal bilateral. A linfadenectomia ilioinguinal consistiu na ressecção em monobloco de linfonodos, vasos linfáticos e tecido aureolar de sustentação da cadeia ilíaca comum, externa e interna, do conteúdo da fossa obturadora e da região inguinal, conforme técnica preconizada no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C.Camargo (GENTIL et al. 1986). Nas linfadenectomias inguinais, a cirurgia limitou-se a essa região, sendo ressecados os linfonodos superficiais e profundos.

3.2.4 Seguimento dos pacientes

O acompanhamento dos pacientes se deu em consultas ambulatoriais. As consultas foram realizadas mensalmente no primeiro semestre, e bimestrais no segundo. Do segundo ao terceiro ano de

seguimento estas consultas passaram a ser trimestrais, sendo após o terceiro ano, realizadas anualmente.

Em todas as consultas eram realizados exame físico sistêmico e locorregional. As radiografias de tórax eram realizadas anualmente ou na vigência de sintomas.

Os pacientes foram classificados segundo o seguimento em:

- a) vivos sem câncer
- b) vivos com câncer
- c) mortos pelo câncer ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até 30 dias pós cirurgia)
- d) mortos por outras causas
- e) perdidos de seguimento

3.2.5 Exame anatomopatológico do tumor primário

As peças cirúrgicas foram fixadas em solução de formalina a 10%. Avaliou-se o tamanho da lesão baseando-se no seu maior diâmetro, extensão em relação à glândula, prepúcio, corpo de pênis, uretra e estruturas adjacentes. No mínimo dois cortes representativos da peça cirúrgica, além de fragmentos da margem de ressecção do tumor foram incluídos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

Os critérios usados para definir as variáveis anatomopatológicas foram:

a) Espessura do tumor:

Medida a partir da superfície até a infiltração da região mais profunda com o auxílio de uma escala milimétrica aplicada sobre o corte histológico. Foram então agrupados em: 1) até 5mm e 2) maior que 5mm.

b) Grau de diferenciação do tumor:

Grau I (bem diferenciado): Caracterizado pela presença de células poligonais estratificadas, numerosas e visíveis pontes intercelulares, poucas mitoses, pequeno grau de anaplasia e evidente queratinização, com numerosos e visíveis pérolas córneas

Grau II (moderadamente diferenciado): Caracterizado pela presença de células poligonais estratificadas, poucas pontes intercelulares, mitoses numerosas e atípicas, pleomorfismo nuclear evidente e com pérolas córneas escassas ou ausentes.

Grau III (pouco diferenciado): Caracterizado pela raridade de células poligonais, com difícil visualização de pontes intercelulares. Predomínio de células pequenas alongadas e indiferenciadas, acentuado pleomorfismo e hipercromasia nuclear com mitoses numerosas e atípicas.

Os tumores com diferentes características histológicas foram classificados segundo o aspecto predominante.

c) Embolização vascular linfática:

Caracterizada por células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular de paredes delgadas, revestidas por células endoteliais desprovidas de fibras musculares lisas ou hemácias.

d) Embolização vascular venosa:

Caracterizada por células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular com hemácias, revestimento endotelial e fibras musculares.

e) Infiltração de corpo esponjoso e cavernoso:

Caracterizado por invasão por células neoplásicas dessas estruturas vistas ao microscópio, parcial ou totalmente.

f) Infiltração Uretral:

Caracterizada quando a neoplasia invadia o epitélio e/ou o córion subjacente.

3.2.6 Confecção do *Tissue Microarray*

Os casos do estudo foram separados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer, sendo identificados os respectivos blocos de parafina para confecção e coloração de novos cortes de HE. Os tumores foram reclassificados por três patologistas (FAS; IWC; AC), identificando-se nestas novas lâminas, as áreas correspondentes aos tumores. Inicialmente, foram construídos quatro blocos pela técnica TMA,

perfazendo um total de 351 casos que posteriormente foram submetidos ao estudo imunoistoquímico.

Cada TMA contém duas lâminas e estas foram *spotadas* em duplicata. O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado de *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA).

A área identificada no bloco de parafina do doador foi puncionada com agulha de 1mm e os cilindros obtidos transferidos para o bloco receptor, em duplicata. Construiu-se um mapa, com identificação detalhada de cada cilindro, permitindo a localização exata de cada caso. Um caso foi definido como adequado, quando o corte resultante ocupou pelo menos 24% da área total do cilindro. Foram realizados cortes seqüenciais de 4µm de espessura, colhidos em lâminas adesivas oriundas da Instrumedics (Hackensack NJ, EUA).

Para maximizar o uso do TMA, todos os cortes foram colhidos em uma única sessão e armazenados para uso posterior. Realizou-se o controle do número de casos avaliáveis pela coloração de uma lâmina a cada 25 cortes e pela contagem dos cilindros quando presentes. O TMA foi considerado esgotado quando acima de 25% das amostras não se encontravam mais presentes nas lâminas.

3.2.7 Técnica de imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram realizadas nas lâminas do TMA. As mesmas foram previamente revestidas por solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano (APTS-Sigma® A3648) diluída a 4% em acetona.

Os cortes histológicos foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com irradiação em banho-maria, utilizando-se tampão EDTA + Tris, pH 9.0 por 40 minutos, deixando-se mais 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com três trocas de 5 minutos cada. Após o bloqueio da peroxidase, também se fez o bloqueio de proteína (DAKO® Protein Block Serum-Free) por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários monoclonais de coelho ciclina D1 (Bio SB® anticorpo pronto para uso) por 2 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada, sendo incubadas, a seguir, com NovoLink Max Polymer (Novocastra), por 30 minutos, à temperatura ambiente, passando em seguida por três lavagens de 5 minutos em PBS. As lâminas foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, DAKO®) e contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck®). As reações foram realizadas em duas lâminas de cada TMA, com intervalo de 60 cortes entre elas, garantindo que as células analisadas não fossem as mesmas. Procedeu-se então a montagem das lâminas em Entellan (MERCK, Germany).

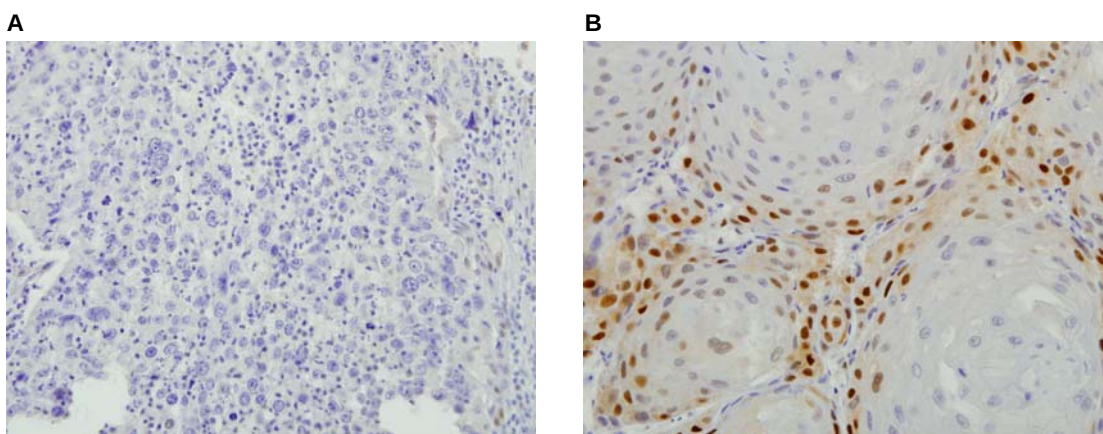


Figura 2 Fotomicrografia de CEC pouco diferenciado demonstrando negatividade para proteína ciclina D1 nas células malignas (A). Fotomicrografia de CEC moderadamente diferenciado demonstrando positividade para proteína ciclina D1 nas células malignas (B).

Deste modo, quatro áreas distintas do tumor foram avaliadas para cada caso. Considerou-se o número de células tumorais que apresentavam positividade nuclear imunoistoquímica nas quatro áreas distintas de cada caso.

Após a análise imunoistoquímica das quatro áreas para todos os 351 casos do TMA, observou-se que 16 casos não apresentaram tumor, ou pela ausência do mesmo na lâmina, ou por perda do tecido durante a fase de confecção das lâminas do TMA, restando assim, 335 casos. Por se tratar de um estudo retrospectivo, optou-se por avaliar a qualidade da imunorreatividade dos casos estudados, através de marcadores específicos para esse fim, utilizando-se citoceratina AE1/AE3 (DAKO®) e Vimentina (DAKO®). O resultado foi uma imunorreatividade baixa em apenas dois casos (0,6%), que foram excluídos, finalizando o banco do estudo com um total de 333 casos.

Os grupos foram então categorizados com base nas médias simples das quatro áreas avaliadas para cada caso (Tabela 1).

Tabela 1- Categorização dos grupos para análise no estudo.

Grupos	Expressão de ciclina D1	%
G1	Negativo	até 5
G2	Positivo	> 5

3.3 CASUÍSTICA

A casuística do estudo foi dividida em duas etapas: aspectos imunoistoquímicos, objetivo maior do nosso trabalho, e aspectos variados, subdividido em: epidemiológicos e clínicos; anatomopatológicos e cirúrgicos, já analisados em trabalhos prévios em pacientes portadores de CEC de pênis.

3.3.1 Aspectos imunoistoquímicos

Dos 333 pacientes estudados, a imunorreatividade nuclear da ciclina D1 foi negativa em 165 casos (49,5%) e positiva em 168 casos (50,5%).

3.3.2 Aspectos epidemiológicos e clínicos

A idade dos 333 pacientes variou de 21 a 87 anos, com média e mediana de 55 anos. Cento e trinta pacientes (39%) apresentavam idade inferior aos 50 anos e duzentos e três pacientes (61%) tinham mais de 50 anos. Apenas treze pacientes (4%) tinham até 30 anos.

Duzentos e cinquenta e seis pacientes (76,9%) eram pertencentes à raça branca, enquanto setenta e sete pacientes (23,1%) eram não brancos.

Dos 333 pacientes, 242 (72,6%) eram casados e 48 (14,6%) não casados (solteiro, viúvo, separado). Em 43 casos (12,8%) não havia informação.

Sobre antecedentes venéreos, apenas 92 (27,6%) referiram ter tido alguma doença venérea, enquanto 113 (33,9%) afirmaram nunca ter tido qualquer doença. Os 128 pacientes restantes (38,5%) não souberam relatar.

Apenas 56 pacientes (16,9%) foram submetidos à postectomia e 255 pacientes (76,6%) não a realizaram.

Na apresentação à primeira consulta, 229 pacientes (68,9%) apresentavam o tumor de pênis intacto, 91 casos (27,4%) submetidos à biópsia do tumor e 9 pacientes (2,6%) já haviam sido amputados em outros serviços. Um caso apenas (0,3%) foi submetido ao tratamento completo com amputação e esvaziamento, vindo somente para acompanhamento neste serviço.

O sintoma mais freqüente foi ferida ou lesão peniana, em 92,8% dos casos, porém como sinal isolado ocorreu em 156 pacientes (50,6%).

O tempo de evolução da doença, desde o seu aparecimento até o diagnóstico foi de, no mínimo 1 mês, e no máximo 240 meses, com média de 17,76 meses e mediana de 8 meses.

De acordo com o estadiamento clínico TNM (2002), 31 pacientes (9,3%) apresentavam tumores T1; 158 (47,6%) apresentavam tumores T2; 114 (34,5%), tumores T3; 16 (4,6%), tumores T4, havendo apenas 14 casos

(4%) sem informação em prontuário. Em relação ao estágio N, foram observados 164 casos (49,4%) N0; 54 casos (16,2%), N1; 100 (29,9%), N2; 10 casos (2,8%) N3 e 5 casos (1,7%), Nx (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência das variáveis clínicas, demográficas e cirúrgicas dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Número de pacientes	%
Idade	até 50 anos	130	39,0
	> 50 anos	203	61,0
Estado civil	casados	242	72,6
	não casados	48	14,6
	sem informação	43	12,8
Raça	branca	256	76,9
	não branca	77	23,1
Tempo de evolução **	até 6 meses	147	45,5
	mais que 6 meses	176	54,5
Antecedentes venéreos	Não	113	33,9
	sim	92	27,6
	sem informação	128	38,5
Estadiamento cT*	T1	31	9,3
	T2	158	47,6
	T3	114	34,5
	T4	16	4,6
	Tx	14	4,0
Estadiamento cN*	N0	164	49,4
	N1	54	16,2
	N2	100	29,9
	N3	10	2,8
	Nx	5	1,7
Cirurgia do tumor primário	Ressecção local	23	6,6
	amputação parcial	191	57,5
	amputação total	119	35,9

*Estadiamento pTNM (UICC 2002- CID-O C67)

**Excluídos os casos sem informação.

3.3.3 Aspectos anatomopatológicos

O grau de diferenciação foi assim representado: 86 pacientes (25,9%) apresentavam tumor grau 1; 109 pacientes (32,7%), tumor grau 2 e 135

(40,5%), tumor grau 3. Em apenas 3 casos (0,9%) não foram obtidas informações.

Dos 333 casos estudados, 86 casos (25,7%) apresentavam espessura tumoral de até 5mm, enquanto 217 casos (65,2%) apresentavam espessura maior do que 5mm. Somente em 30 casos (9,1%) não foram obtidas informações.

A permeação linfática não foi constatada em 216 pacientes (65%), estando presente em 93 pacientes (27,9%).

A invasão vascular foi constatada em 80 casos (24,0%) e estava ausente em 229 casos (68,8%).

Foi observada a infiltração dos corpos cavernosos em 163 casos (49%) e a sua ausência em 92 casos (27,6%). Os casos sem informação totalizaram 78 (23,4%).

A invasão do corpo esponjoso esteve presente em 240 casos (72,1%), enquanto a sua ausência foi identificada em 26 casos (7,7%), sendo 67 casos (20,2%) sem informação.

A invasão uretral estava presente em 89 casos (26,8%) e ausente em 138 casos (41,3%), sendo 106 casos (31,9%) sem informação.

A coilocitose foi outro aspecto estudado, presente em 74 casos (22,2%). Sua ausência foi constatada em 58 casos (17,4%), com 201 casos (60,4%) sem informação (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência das variáveis anatomopatológicas dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Número de pacientes	%
Grau de diferenciação *	I	86	26,1
	II	109	33,0
	III	135	40,9
Espessura do tumor	até 5mm	86	25,7
	> 5mm	217	65,2
	indeterminada	30	9,1
Permeação linfática	ausente	216	65,0
	presente	93	27,9
	indeterminada	24	7,1
Embolização venosa	ausente	229	68,8
	presente	80	24,0
	indeterminada	24	7,2
Infiltração de corpos cavernosos	ausente	92	27,6
	presente	163	49,0
	indeterminada	78	23,4
Infiltração da uretra	ausente	138	41,3
	presente	89	26,8
	indeterminada	106	31,9
Coilocitose	presente	58	17,4
	ausente	74	22,2
	indeterminada	201	60,4

*Excluídos os casos sem informação

3.3.4 Aspectos cirúrgicos

O tipo de cirurgia predominante foi a amputação parcial, realizada em 191 pacientes (57,5%), enquanto a amputação total ocorreu em 119 casos (35,9%) e a ressecção local em apenas 23 casos (6,6%) (tabela 2). As mais frequentes complicações da amputação, por ordem decrescente, foram: estenose, com 47 casos (14,2%); deiscência, com 9 casos (2,6%); infecção, com 3 casos (0,9%) e hemorragia, com 2 casos (0,6%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Número e porcentagem de pacientes segundo as complicações mais frequentes relacionadas à amputação de pênis em 333 pacientes com carcinoma peniano.

Complicação	Pacientes n (%)
Sem complicação	260 (78,1)
Estenose de uretra	47 (14,2)
Deiscência	9 (2,6)
Infecção	3 (0,9)
Hemorragia	2 (0,6)
Outras	11 (3,3)
Sem informação	1 (0,3)
Total	333 (100)

Os pacientes submetidos à linfadenectomia totalizaram 150, sendo 53 casos de linfadenectomia inguinal (15,9%) e 97 casos de linfadenectomia ílio-inguinal (29,1%). Os 183 pacientes que não foram submetidos à linfadenectomia representaram 55% do total de pacientes. Estes últimos foram acompanhados por um período maior ou igual a 5 anos (Tabela 5).

Tabela 5 - Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 333 pacientes portadores de câncer de pênis.

Tipo de inguino-crural esvaziamento	N	%
Linfadenectomia inguino-crural	53	15,9
Linfadenectomia inguino-ílfaco	97	29,1
Sem linfadenectomia	183	55,0
Total	333	100

No total foram dissecados 4.577 linfonodos, nos 150 pacientes submetidos à linfadenectomia, com uma média de 30,5 linfonodos por paciente, variando de 2 a 87 linfonodos.

Dos 333 casos, 150 pacientes (45%) foram linfadenectomizados, sendo que em 78 pacientes (52,0%) os linfonodos apresentaram acometimento neoplásico, enquanto nos outros 72 pacientes (48,0%) não foram encontradas metástases linfonodais.

Houve um total de 308 linfonodos acometidos pelo tumor, com variação de 1 a 25, representando 6,73% do total de linfonodos dissecados (4.577 linfonodos) (Tabela 6). A média de linfonodos positivos por paciente foi de 2,05 entre aqueles doentes submetidos à linfadenectomia.

Em relação à lateralidade dos linfonodos positivos, em 40 pacientes (12%) a positividade foi unilateral, enquanto em 36 pacientes (10,8%) foi bilateral. Não houve informações em apenas 2 pacientes (0,6%).

Dos 333 casos estudados, 78 pacientes (23,4%) com linfonodos positivos, apresentavam informações sobre a topografia dos mesmos, com 57 pacientes (17,1%) submetidos à linfadenectomia inguinal e 12 pacientes (3,7%) à linfadenectomia ínguino-ílica. Em 9 pacientes (2,6%) não houve informações. Em 72 pacientes (21,6%) submetidos à linfadenectomia, os linfonodos foram negativos, e os 183 pacientes (55%) restantes, não foram submetidos à linfadenectomia (Tabela 7).

Tabela 6 - Número e porcentagem de linfonodos metastáticos nos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Número de pacientes (%)	Número de linfonodos metastáticos
72 (21,6)	0
21 (6,3)	1
18 (5,4)	2
12 (3,6)	3
9 (2,8)	4
8 (2,6)	5
3 (0,9)	6
2 (0,3)	9
1 (0,3)	15
1 (0,3)	18
1 (0,3)	21
1 (0,3)	24
1 (0,3)	25
183 (55,0)	Não realizaram linfadenectomia
Total 333 (100)	308

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes segundo tipo de esvaziamento realizado.

Tipo de esvaziamento	Número de pacientes (%)
Inguinal	57 (17,1)
Inguino-ilíaco	12 (3,7)
Ignorado	9 (2,6)
Linfonodos negativos	72 (21,6)
Não realizaram linfadenectomia	183 (55,0)
Total	333 (100)

Dos 333 casos, 150 pacientes (45%) foram submetidos à linfadenectomia e destes, 120 (80,0%) apresentaram complicações isoladas ou associadas. Destas, a mais freqüente isoladamente foi o linfedema, representando 12 casos (8,2%), seguido pela deiscência, com 9 casos (5,8%). As complicações associadas foram as mais comuns (62,0%) (Tabela 8).

Tabela 8 - Número e porcentagem de pacientes segundo complicação relacionada à linfadenectomia em 333 pacientes de carcinoma peniano.

Complicação	Pacientes n(%)
Complicações associadas	93 (62,0)
Ruptura de vasos (isolado)	2 (1,4)
Linfedema (isolado)	12 (8,2)
Infecção (isolada)	4 (2,6)
Deiscência (isolada)	9 (5,8)
Sem complicações	29 (19,3)
Ignorado ou não se aplica	1 (0,7)
Total	150 (100)

O tempo de seguimento variou de 0,1 a 452,8 meses, com média de 100 e mediana de 71,4 meses.

Em 90 pacientes (27,1%) houve recorrência tumoral. Destes, 56 casos (16,8%) apresentam recorrência locoregional, enquanto 11 casos (3,4%) à distância. Nos outros 8 casos (2,3%) a recorrência foi locoregional e à distância. Houve 15 casos (4,6%) sem informação e, nos 243 casos restantes (72,9%), não houve recorrência.

Ao final do seguimento, 124 pacientes (37%) estavam vivos sem doença, 21 pacientes (6,3%) estavam vivos com doença, 56 pacientes (16,8%) foram a óbito em decorrência do câncer ou de complicações do tratamento (incluindo óbitos até 30 dias após cirurgia). Cento e sete pacientes faleceram por outras causas (32,2%) e 25 pacientes foram perdidos de vista (7,7%) (Tabela 9).

Dentre os perdidos de vista, 19 casos (76,0%) ocorreram antes de 1 ano, 4 casos (16,0%) após 1 ano e 2 casos (8,0%) após 2 anos de seguimento.

Tabela 9 - Situação clínica dos 333 pacientes de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.

Situação clínica	n	%
Vivos sem doença	124	37,0
Vivos com doença	21	6,3
Óbito por câncer/ complicação do tratamento	56	16,8
Óbito por outra causa	107	32,2
Perdidos de seguimento	25	7,7

Seguimento (meses): média de 100 (dp= 96,5) e mediana de 71,4 (0,1 a 452,8)

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados dos prontuários dos pacientes através do preenchimento de uma ficha de levantamento padronizada (Anexo 1) e, após esta coleta, digitados num banco de dados, utilizando-se o software *Windows Statistical Package for Social Science (SPSS)*, versão 15.0.

A distribuição das variáveis clínicas, anatomopatológicas e referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingências.

As associações das variáveis qualitativas com expressão da ciclina D1 e presença de metástase linfonodal foram efetuadas com o teste do qui-quadrado bi-caudal. Sempre que necessário, utilizou-se o valor do qui-quadrado bi-caudal corrigido (Teste de Fisher), quando as frequências esperadas eram inferiores a 5, dentro de uma tabela maior que 2x2.

A identificação dos fatores independentes relacionados com a metástase linfonodal e com a expressão da ciclina D1, foi realizada pela regressão logística múltipla. As variáveis para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada ($p < 0,050$), bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20.

As sobrevidas global, livre de doença e câncer específica, foram analisadas pelo estimador produto de limite de Kaplan e Meier, e a comparação entre as curvas através do teste de Long-rank. Na análise multivariada para sobrevida usou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox, calculando-se as 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 análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20.

Calculou-se o tempo de sobrevida global como o período entre o início do tratamento e a data da última informação objetiva observada (para os pacientes vivos naquela data) ou a data do óbito decorrente por qualquer

motivo. Os pacientes vivos na data da última informação foram considerados sob censura para a curva de sobrevida pelo método de Kaplan e Meier ou para utilização da regressão de Cox.

Pacientes que não compareceram às consultas ou sem informações, por um período superior a duas vezes o estipulado para retorno, foram considerados perdidos de seguimento 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 foi obtido pela estratégia *stepwise forward selection*, na qual, a partir da variável de maior significância na análise univariada, foram acrescentadas as outras variáveis, uma a uma, em ordem crescente.

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas e com eliminação de casa decimais. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

3.5 ANÁLISE DE RISCO E ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de estudo retrospectivo, não há a participação direta de pacientes, nem a introdução de qualquer modificação terapêutica ou aplicação de qualquer medicação ou método que possa gerar danos, benefícios e outras consequências a qualquer paciente.

Desta forma, não foi necessária a adoção de consentimento pós-informado.

Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. O uso do material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois a terapêutica julgada necessária para os mesmos, já havia sido instituída.

O projeto foi avaliado pela comissão de Ética e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo e aprovado em 21/02/2006, sendo protocolado na referida comissão sob o número 776/06.

4 RESULTADOS

4.1 IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLINA D1

4.1.1 Análise univariada

A imunorreatividade nuclear da ciclina D1 foi negativa em 165 casos (49,5%) e positiva em 168 casos (50,5%). Não houve associação entre os índices de imunorreatividade da ciclina D1 com as variáveis clínico-demográficas (idade, raça, antecedentes venéreos, estadiamento clínico T e estadiamento clínico N). Apresentaram significância estatística para as variáveis: realização de postectomia ($p=0,001$) e tempo de evolução ($p=0,021$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Imunorreatividade da ciclina D1 segundo variáveis clínico-demográficas nos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Ciclina D1		p (χ^2)
		Negativa n (%)	Positiva n (%)	
Idade	até 50 anos	62 (47,3)	69 (52,7)	0,514
	mais que 50 anos	103 (51,0)	99 (49,0)	
Raça	Branca	130 (50,4)	128 (49,6)	0,571
	não branca	35 (46,7)	40 (53,3)	
Tempo de evolução *	até 6 meses	63 (42,6)	85 (57,4)	0,021**
	mais que 6 meses	97 (55,4)	78 (44,6)	
Antecedentes venéreos*	Não	46 (41,8)	64 (58,2)	0,054**
	sim	51 (55,4)	41 (44,6)	
Postectomia *	Não	135 (53,4)	118 (46,6)	0,001**
	sim	17 (29,8)	40 (70,2)	
Estadiamento Tc *	T1 - T2	86 (45,5)	103 (54,5)	0,110**
	T3 - T4	71 (54,6)	59 (45,4)	
Estadiamento Nc *	N negativo	75 (44,9)	92 (55,1)	0,087**
	N positivo	87 (54,4)	73 (45,6)	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Não houve associação entre os índices de imunorreatividade da ciclina D1 com algumas variáveis anatomopatológicas (coilocitose, infiltração de órgãos adjacentes, permeação linfática e espessura tumoral). Por outro lado, algumas variáveis apresentaram significância estatística: infiltração uretral ($p=0,005$), infiltração de corpos cavernosos ($p=0,012$), embolização venosa ($p=0,033$) e diferenciação histológica do tumor ($p=0,037$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Imunorreatividade da Ciclina D1 segundo variáveis anatomopatológicas em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Ciclina D1		p (χ^2)
		Negativa n (%)	Positiva n (%)	
Grau de diferenciação *	Grau I	50 (59,5)	34 (40,5)	0,037**
	Graus II - III	114 (46,3)	132 (53,7)	
Espessura tumoral*	até 5mm	38 (45,2)	46 (54,8)	0,242
	maior que 5mm	115 (52,8)	103 (47,2)	
Permeação linfática*	Não	101 (46,8)	115 (53,2)	0,099**
	sim	53 (57,0)	40 (43,0)	
Embolização venosa*	Não	104 (46,0)	122 (54,0)	0,033**
	sim	49 (59,8)	33 (40,2)	
Infiltração de corpos cavernosos*	Não	36 (38,3)	58 (61,7)	0,012**
	sim	89 (54,6)	74 (45,4)	
Infiltração da uretra *	Não	59 (41,8)	82 (58,2)	0,005**
	sim	54 (60,7)	35 (39,3)	
Infiltração de órgãos adjacentes *	Não	10 (37,0)	17 (63,0)	0,181**
	sim	122 (50,6)	119 (49,4)	
Coilocitose *	presente	34 (60,7)	22 (39,3)	0,991
	ausente	45 (60,8)	29 (39,2)	
Metástase linfonodal	Ausente	126 (49,4)	129 (50,6)	0,928
	presente	39 (50,0)	39 (50,0)	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e aquelas que atingiram valores de p até 0,20 estão listadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p (χ^2)
Postectomia	0,001
Infiltração da uretra	0,005
Infiltração de corpos cavernosos	0,012
Tempo de evolução	0,021
Embolização venosa	0,033
Grau de diferenciação	0,037
Estadiamento Nc	0,087
Permeação linfática	0,099
Estadiamento Tc	0,110
Infiltração de órgãos adjacentes	0,181

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o grau de diferenciação do tumor (RR = 2,68; IC 95% [1,3 – 5,7]) foi fator independente para a expressão da ciclina D1 (Tabela 13).

Tabela 13 - Variáveis independentes relacionadas com a expressão da ciclina D1 em 333 pacientes portadores de CEC de pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	Rr	IC 95%
Grau de diferenciação	Grau I	1	Ref.
	Graus II - III	2,68	1,3 – 5,7

4.2 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASES LINFONODAIS

4.2.1 Análise univariada

Dentre as variáveis clínico-demográficas avaliadas, as que se associaram com a presença de metástase linfonodal na análise univariada foram o estadiamento clínico N ($p=0,001$) e o estadiamento clínico T ($p=0,011$). As demais variáveis avaliadas não apresentaram nenhuma associação (Tabela 14).

Tabela 14 - Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Linfonodo		p (χ^2)
		negativo n (%)	positivo n (%)	
Idade	até 50 anos	96 (73,8)	34 (26,2)	0,302
	mais que 50 anos	159 (78,3)	44 (21,7)	
Estado civil*	não casados	36 (75,0)	12 (25,0)	0,763
	casados	187 (77,3)	55 (22,7)	
Raça	Branca	195 (76,2)	61 (23,8)	0,782
	não branca	60 (77,9)	17 (22,1)	
Tempo de evolução *	até 6 meses	111 (75,5)	36 (24,5)	0,675
	mais que 6 meses	136 (77,3)	40 (22,7)	
Antecedentes venéreos*	Não	84 (74,3)	29 (25,7)	0,452
	sim	72 (78,3)	20 (21,7)	
Postectomia*	Não	193 (75,6)	62 (24,4)	0,530
	sim	45 (80,4)	11 (19,6)	
Estadiamento Tc*	T1 - T2	156 (82,5)	33 (17,5)	0,011**
	T3 - T4	92 (70,8)	38 (29,2)	
Estadiamento Nc*	N negativo	154 (93,9)	10 (6,1)	0,001**
	N positivo	97 (59,1)	67 (40,9)	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

De acordo com as variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas, as seguintes associaram-se significativamente com a presença de metástases linfonodais na análise univariada: grau de diferenciação histológica do tumor ($p=0,001$), permeação linfática ($p=0,001$), embolização venosa ($p=0,001$), infiltração de corpos cavernosos ($p=0,001$), infiltração uretral ($p=0,001$) e infiltração de órgãos adjacentes ($p=0,037$). A expressão da ciclina D1, presença de coilocitose, assim como a espessura tumoral não apresentaram significância estatística (Tabela 15).

Tabela 15 - Status linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímica dos 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Linfonodo		p (χ^2)
		negativo n (%)	positivo n (%)	
Grau de diferenciação *	Gau I	84 (97,7)	2 (2,3)	0,001**
	Graus II - III	168 (68,9)	76 (31,1)	
Espessura tumoral *	até 5mm	71 (82,6)	15 (17,4)	0,084**
	maior que 5mm	159 (73,3)	58 (26,7)	
Permeação linfática *	Não	191 (88,4)	25 (11,6)	0,001**
	sim	42 (45,2)	51 (54,8)	
Embolização venosa *	Não	187 (81,7)	42 (18,3)	0,001**
	sim	46 (57,5)	34 (42,5)	
Infiltração de corpos cavernosos *	Não	79 (85,9)	13 (14,1)	0,001**
	sim	107 (65,6)	56 (34,4)	
Infiltração da uretra *	Não	115 (83,3)	23 (16,7)	0,001**
	sim	56 (62,9)	33 (37,1)	
Infiltração de órgãos adjacentes *	Não	24 (92,3)	2 (7,7)	0,037**
	sim	179 (74,6)	61 (25,4)	
Coilocitose *	Presente	31 (54,4)	27 (45,6)	0,299
	ausente	46 (62,2)	28 (37,8)	
Expressão de ciclina D1	negativa (até 5%)	126 (76,4)	39 (23,6)	0,928
	positiva (maior que 5%)	129 (76,8)	39 (23,2)	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

4.2.2 Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e aquelas que atingiram valores de p até 0,20 estão listadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p (χ^2)
Infiltração de corpos cavernosos	0,001
Infiltração da uretra	0,001
Embolização venosa	0,001
Permeação linfática	0,001
Estadiamento Nc	0,001
Grau de diferenciação	0,001
Estadiamento Tc	0,011
Infiltração de órgãos adjacentes	0,037
Espessura tumoral	0,084

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a permeação linfática (RR = 5,68; IC 95% [2,8 – 11,7]), estadiamento clínico N (RR = 9,12; IC 95% [3,9 – 21,3]) e grau de diferenciação histológica tumoral (RR = 24,56; IC 95% [3,2 – 190,8]) foram fatores independentes de risco para comprometimento metastático dos linfonodos (Tabela 17).

Tabela 17 – Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal nos 333 pacientes portadores de CEC de pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	Rr	IC 95%
Permeação linfática	não	1	Ref.
	sim	5,68	2,8 – 11,7
Estadiamento Nc	N negativo	1	Ref.
	N positivo	9,12	3,9 – 21,3
Grau de diferenciação	Grau I	1	Ref.
	Graus II - III	24,56	3,2 – 190,8

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.3.1 Sobrevida livre de doença

A Análise univariada

A sobrevida livre de doença da população estudada foi de 76,9% (Figura 3).

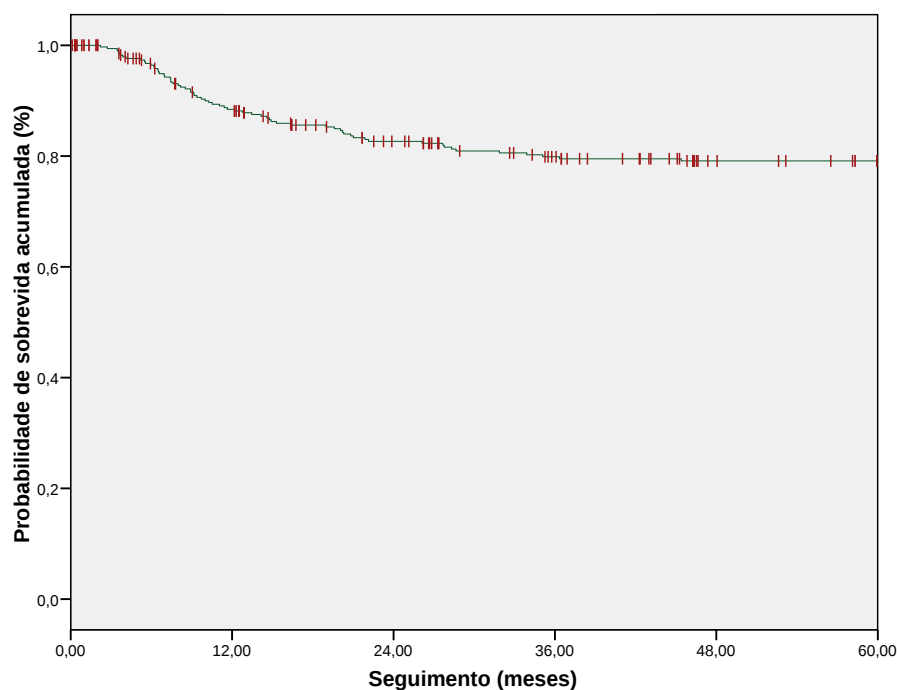


Figura 3 - Curva de sobrevida livre de doença para 333 pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença foram o estadiamento clínico N ($p=0,001$) e o estadiamento clínico T ($p=0,001$) (Tabela 18).

Tabela 18 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos, de acordo com variáveis clínicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p (log rank)
Idade	até 50 anos	130	72,5	0,152**
	mais que 50 anos	203	79,8	
Raça	Branca	256	76,6	0,965
	não branca	77	77,7	
Tempo de evolução	até 6 meses	147	72,6	0,179**
	mais que 6 meses	176	80,3	
Antecedentes venéreos	Não	113	71,8	0,132**
	sim	92	79,9	
Postectomia	Não	255	77,2	0,662
	sim	56	73,4	
Estadiamento Tc	T1 - T2	189	85,3	0,001**
	T3 - T4	130	67,0	
Estadiamento Nc	N negativo	164	86,5	0,001**
	N positivo	164	66,9	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença, encontram-se: grau de diferenciação tumoral ($p=0,001$), espessura do tumor ($p=0,001$), embolização venosa ($p=0,001$), permeação linfática ($p=0,001$), metástase linfonodal ($p=0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p=0,003$) e infiltração uretral ($p=0,005$) (Tabela 19).

Tabela 19 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p (log rank)
Grau de diferenciação	Gau I	86	97,7	0,001**
	Graus II – III	244	69,6	
Espessura tumoral	até 5mm	86	89,2	0,001**
	maior que 5mm	217	71,5	
Permeação linfática	Não	216	86,2	0,001**
	sim	93	54,2	
Embolização venosa	Não	229	83,1	0,001**
	sim	80	58,7	
Infiltração de corpos cavernosos	Não	92	86,7	0,003**
	sim	163	68,3	
Infiltração da uretra	Não	138	84,3	0,005**
	sim	89	65,7	
Infiltração de órgãos adjacentes	Não	26	87,8	0,406
	sim	240	76,2	
Coilocitose	presente	58	73,2	0,562
	ausente	74	75,7	
Metástase linfonodal	Ausente	255	86,2	0,001**
	presente	78	41,8	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

A imunorreatividade da ciclina D1 não apresentou significância estatística para a sobrevida livre de doença (Tabela 20).

Tabela 20 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença em 5 anos, de acordo com a expressão imunoistoquímica da ciclina D1, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p (log rank)
Expressão ciclina D1	Negativa (até 5%)	165	81,5	0,059**
	Positiva (maior que 5%)	168	70,7	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

B Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística, na análise univariada, para a sobrevida livre de doença foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20 (Tabela 21).

Tabela 21 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	p (χ^2)
Metástase linfonodal	0,001
Estadiamento Nc	0,001
Grau de diferenciação	0,001
Espessura tumoral	0,001
Estadiamento Tc	0,001
Embolização venosa	0,001
Permeação linfática	0,001
Infiltração de corpos cavernosos	0,003
Infiltração da uretra	0,005
Expressão cíclica D1	0,059
Antecedentes venéreos	0,132
Idade	0,152
Tempo de evolução	0,179

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a metástase linfonodal (RR = 3,4; IC 95% [(2,0 – 5,6)]), a diferenciação tumoral (RR = 8,4; IC 95% [(2,0 – 35,2)]), a espessura do tumor (RR = 3,3; IC 95% [(1,5 – 7,3)] e

o estadiamento clínico T (RR = 1,8; IC 95% [(1,1 – 3,0)]) foram fatores independentes de risco para recidiva de doença (Tabela 22).

Tabela 22 - Risco de recorrência de doença em pacientes portadores de carcinoma peniano. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	Rr	IC 95%
Metástase linfonodal	ausente	1	Ref.
	presente	3,4	2,0 – 5,6
Grau de diferenciação	Grau I	1	Ref.
	Graus II - III	8,4	2,0– 35,2
Espessura tumoral	até 5mm	1	Ref.
	maior que 5mm	3,3	1,5 – 7,3
Estadiamento Tc	T1 - T2	1	Ref.
	T3 - T4	1,8	1,1 – 3,0

4.3.2 Sobrevida global

A Análise univariada

A sobrevida global em 5 e em 10 anos para os 333 pacientes portadores de CEC de pênis foi de 73,1% e 57,1% respectivamente (Figura 4).

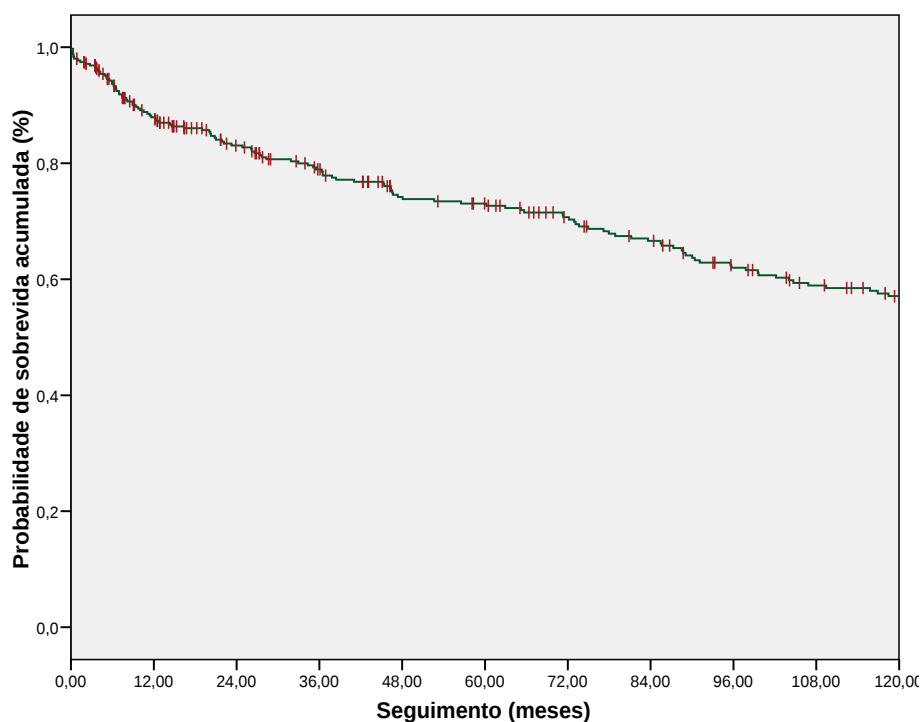


Figura 4 - Curva de sobrevida global para os 333 pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas que influenciaram significativamente a sobrevida global, estão a idade ($p=0,001$), estado civil ($p=0,001$), estadiamento clínico N ($p=0,001$), postectomia ($p=0,004$) e estadiamento clínico T ($p=0,021$) (Tabela 23).

Tabela 23 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 e em 10 anos, de acordo com variáveis clínicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida global		p (x ²)
			5 anos (%)	10 anos (%)	
Idade	até 50 anos	130	77,9	72,1	0,001**
	mais que 50 anos	203	70,0	48,4	
Estado civil	não casado	48	57,2	49,1	0,001**
	casado	242	76,2	60,7	
Raça	branca	256	73,3	56,9	0,618
	não branca	77	72,4	58,3	
Tempo de evolução	até 6 meses	147	71,1	58,5	0,983**
	mais que 6 meses	176	75,8	56,9	
Antecedentes venéreos	Não	113	75,7	65,1	0,958
	sim	92	75,4	50,8	
Postectomia	Não	255	71,0	53,1	0,004**
	sim	56	85,7	79,2	
Estadiamento Tc	T1 – T2	189	76,5	63,1	0,021**
	T3 - T4	130	68,7	50,4	
Estadiamento Nc	N negativo	164	80,8	68,6	0,001**
	N positivo	164	65,0	45,0	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida global, encontram-se: embolização venosa (p=0,001), permeação linfática (p=0,001), metástase linfonodal (p=0,001), grau de diferenciação tumoral (p=0,001), espessura tumoral (p=0,034), infiltração de corpo cavernoso (p=0,041) e infiltração uretral (p=0,045) (Tabela 24).

Tabela 24 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 e em 10 anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida global		p (x ²)
			5 anos (%)	10 anos (%)	
Grau de diferenciação	Gau I	86	87,8	76,0	0,001**
	Graus II - III	244	67,3	49,0	
Espessura tumoral	até 5mm	86	80,0	68,6	0,034**
	maior que 5mm	217	70,0	51,5	
Permeação linfática	Não	216	79,8	64,1	0,001**
	sim	93	56,4	40,2	
Embolização venosa	Não	229	79,2	62,7	0,001**
	sim	80	54,6	40,7	
Infiltração de corpos cavernosos	Não	92	80,8	70,2	0,041**
	sim	163	67,2	49,5	
Infiltração da uretra	Não	138	78,6	66,9	0,045**
	sim	89	63,8	47,3	
Infiltração de órgãos adjacentes	Não	26	84,7	79,4	0,230
	sim	240	74,7	56,8	
Coilocitose	presente	58	64,1	48,9	0,180**
	ausente	74	70,1	49,1	
Metástase linfonodal	Ausente	255	80,9	63,9	0,001**
	presente	78	43,3	30,7	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Em relação à análise das variáveis imunoistoquímicas, a imunorreatividade da Ciclina D1 não apresentou significância estatística em relação à sobrevida global (p=0,253) (Tabela 25).

Tabela 25 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 e em 10 anos, de acordo com a imunorreatividade imunoistoquímica da ciclina D1, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida global		P (χ^2)
			5 anos (%)	10 anos (%)	
Expressão ciclina D1	Negativa (até 5%)	165	74,1	51,6	0,253
	Positiva (maior que 5%)	168	74,2	64,1	

* Excluídos os casos sem informação.

B Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística, na análise univariada, para a sobrevida global foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20 (Tabela 26).

Tabela 26 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	p (χ^2)
Metástase linfonodal	0,001
Estado civil	0,001
Embolização venosa	0,001
Permeação linfática	0,001
Idade	0,001
Estadiamento Nc	0,001
Grau de diferenciação	0,001
Postectomia	0,004
Estadiamento Tc	0,021
Espessura tumoral	0,034
Infiltração de corpos cavernosos	0,041
Infiltração da uretra	0,045
Coilocitose	0,180

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a idade (RR = 2,8; IC 95% [2,0 – 4,1]), metástase linfonodal (RR = 2,4; IC 95% [1,6 – 3,6]) e permeação linfática (RR = 1,9; IC 95% [1,3 – 2,8]) foram fatores independentes para o risco de óbito (Tabela 27).

Tabela 27 - Risco de óbito em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	Rr	IC 95%
Idade	Até 50 anos	1	Ref.
	mais que 50 anos	2,8	2,0 – 4,1
Metástase linfonodal	ausente	1	Ref.
	presente	2,4	1,6 – 3,6
Permeação linfática	não	1	Ref.
	sim	1,9	1,3 – 2,8

4.3.3 Sobrevida câncer específica

A Análise univariada

A sobrevida câncer específica em 5 anos para os 333 pacientes portadores de CEC de pênis foi de 82,8% (Figura 5).

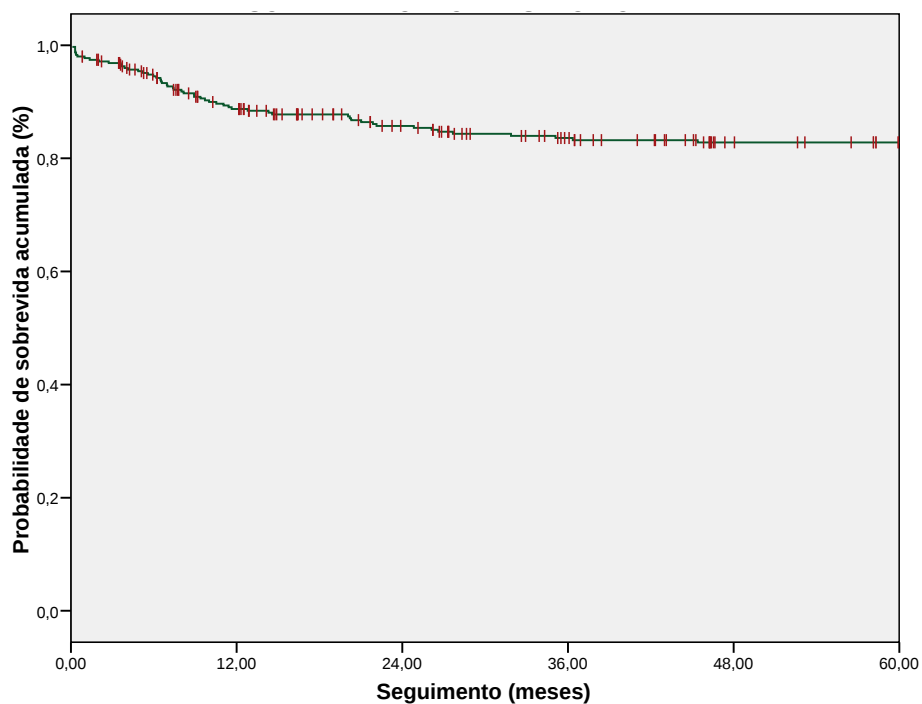


Figura 5 - Curva de sobrevida câncer específica para 333 pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas que influenciaram significativamente na sobrevida câncer específica estão o estadiamento clínico N ($p=0,001$) e o estadiamento clínico T ($p=0,020$) (Tabela 28).

Tabela 28 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos, de acordo com variáveis clínicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p (log rank)
Idade	até 50 anos	130	81,5	0,964
	mais que 50 anos	203	83,7	
Estado Civil	não casado	48	83,5	0,236
	casado	242	80,5	
Raça	Branca	256	80,9	0,641
	não branca	77	85,4	
Tempo de evolução	até 6 meses	147	88,0	0,020**
	mais que 6 meses	176	77,1	
Estadiamento Tc	T1 - T2	189	90,7	0,001**
	T3 - T4	130	75,0	
Estadiamento Nc	N negativo	164	81,5	0,092**
	N positivo	164	90,8	
Postectomia	Não	255	65,7	0,149**
	sim	56	84,8	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica encontram-se: grau de diferenciação tumoral ($p=0,001$), permeação linfática ($p=0,001$), metástase linfonodal ($p=0,001$), embolização venosa ($p=0,003$), espessura do tumor ($p=0,013$) e infiltração de corpo cavernoso ($p=0,039$) (Tabela 29).

Tabela 29 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p (log rank)
Grau de diferenciação	Gau I	86	94,1	0,001**
	Graus II – III	244	78,4	
Espessura tumoral	até 5mm	86	89,3	0,013**
	maior que 5mm	217	79,2	
Permeação linfática	Não	216	90,2	0,001**
	sim	93	65,2	
Embolização venosa	Não	229	87,4	0,003**
	sim	80	71,2	
Infiltração de corpos cavernosos	Não	92	88,7	0,039**
	sim	163	78,5	
Infiltração da uretra	Não	138	87,0	0,135**
	sim	89	77,2	
Infiltração de órgãos adjacentes	Não	26	88,3	0,529
	sim	240	84,1	
Coilocitose	presente	58	73,4	0,096**
	ausente	74	83,3	
Metástase linfonodal	Ausente	255	90,4	0,001**
	presente	78	54,0	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

A imunorreatividade da ciclina D1 não apresentou significância estatística para a sobrevida câncer específica (Tabela 30).

Tabela 30 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específico em 5 anos, de acordo com a expressão imunoistoquímica da Ciclina D1, em 333 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p (log rank)
Expressão ciclina D1	Negativa (até 5%)	165	83,9	0,626
	Positiva (maior que 5%)	168	80,5	

* Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

B Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística, na análise univariada, para a sobrevida câncer específica foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20 (Tabela 31).

Tabela 31 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Consideradas como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	p (χ^2)
Metástase linfonodal	0,001
Estadiamento Nc	0,001
Grau de diferenciação	0,001
Permeação linfática	0,001
Embolização venosa	0,003
Espessura tumoral	0,013
Estadiamento Tc	0,020
Infiltração de corpos cavernosos	0,039
Postectomia	0,092
Coilocitose	0,096
Infiltração da uretra	0,135
Estado Civil	0,149

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a metástase linfonodal (RR = 5,2; IC 95% [(3,0 – 8,9)] e a espessura do tumor (RR = 2,2; IC 95% [(1,1 – 4,6)]) foram fatores independentes de risco para óbito por câncer (Tabela 32).

Tabela 32 - Risco de óbito por câncer em pacientes portadores de carcinoma peniano em 333 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	Rr	IC 95%
Metástase linfonodal	ausente	1	Ref.
	presente	5,2	3,0 – 8,9
Espessura tumoral	até 5mm	1	Ref.
	maior que 5mm	2,2	1,1 – 4,6

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

O câncer de pênis é uma neoplasia rara nos países desenvolvidos, muito provavelmente pelo desenvolvimento de medidas preventivas, de diagnóstico precoce e tratamento adequado desta doença. A maioria dos estudos com grandes incidências que possibilite a identificação de fatores de risco para a ocorrência de metástases, tem origem em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos (KAMAT et al. 1993; LOPES et al. 1996b; MISRA et al. 2004).

O pico de incidência é em geral entre a 4ª e 7ª décadas de vida. No presente estudo, a média de idade foi de 55 anos, com 39% da amostra estando abaixo dos 50 anos e apenas 4% com até 30 anos. Na literatura, a média das séries estudadas encontra-se entre a 5ª e 6ª décadas (NARAYANA et al. 1982; MADEN et al. 1993; KAMAT et al. 1993; HORENBLAS et al. 1993; FICARRA et al. 2006; CAMPOS et al. 2006).

Fatores associados fortemente ao câncer de pênis como más condições de higiene, presença de fimose ou excesso de prepúcio e baixa condição socioeconômica, são características comuns à grande maioria desses pacientes (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; BRINTON et al. 1991; LOPES et al. 1993). Existem aqueles que ressaltam a presença de prováveis substâncias irritativas no esmegma, porém com resultados

conflitantes (FISHMAN et al. 1942; DENNIS et al. 1956). Nesse presente estudo, foram 56 (16,9%) pacientes postectomizados de um total de 333 estudados, sendo apenas 15 (4,6%) desses, operados sem relação com o tumor primário. Os dados encontrados corroboram os da literatura. Estudos mais antigos (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGAGHARAN 1967), já mostravam a relação da postectomia na incidência do câncer peniano, ressaltando incidência nula em algumas populações estudadas independente dos aspectos (religiosos e/ou culturais) para a realização da mesma. Outros, demonstraram não só a importância do procedimento em si, mas também a importância da idade do paciente no momento da realização da postectomia, sugerindo o nascimento como momento ideal na prevenção (FREW et al. 1976; JOHNSON et al. 1973). Ressaltando um risco aumentado em 3,2 vezes quando comparada a realização da postectomia após o nascimento e ao nascer (SCHOEN et al. 2000). Com isso a postectomia hoje, constitui-se um excelente fator de proteção que deve ser utilizado sempre em favor do paciente, fazendo parte de medidas de prevenção em saúde pública.

O quadro clínico inicial predominante na maioria dos pacientes com câncer de pênis é o aparecimento de uma ferida no órgão que não cicatriza, apresentando progressão contínua. Em nossa série, obtivemos este sinal em 92,8% dos casos, fato este semelhante em outras séries (ORNELLAS et al. 1994; ADEYOJU et al. 1997).

O tempo de evolução da doença é um aspecto a ser levado em conta. Nossa casuística mostrou uma média de 17 meses entre o primeiro

sinal/sintoma até o início do tratamento. Esse fato pode ser explicado não só pelo baixo nível de educação desses doentes, mas também pela dificuldade de acesso à saúde, principalmente ao especialista, na maioria das cidades pobres do interior do Brasil.

Em relação à apresentação clínica da doença na primeira consulta ao especialista foi observado, nesta série, que 68,9% dos pacientes apresentavam o tumor primário intacto, enquanto apenas 2,6% dos mesmos chegavam ao consultório do especialista já amputados. A biópsia do tumor foi realizada em 27,4% dos casos. Os dados mais uma vez, corroboram a dificuldade do diagnóstico e tratamento adequados em países como o Brasil.

Existe um consenso de que o carcinoma de pênis deve ser diagnosticado e tratado precocemente. Os fatores de risco devem ser evitados. Sabe-se que o tratamento de escolha é o cirúrgico, variando a extensão da cirurgia de acordo com o tamanho e a invasão do tumor. É notório que a linfadenectomia, quando indicada, representa a única forma de cura do tumor, determinando um bom prognóstico para o doente, já que a presença de metástase linfonodal representa o principal fator de prognóstico do carcinoma peniano. A grande questão no tratamento desta doença ainda é a alta morbidade da linfadenectomia, que muitas vezes é indicada sem critérios bem definidos, pois os métodos utilizados para o diagnóstico dessas metástases, representam ainda, altos índices de falso positivo e de falso negativo.

Diversos estudos vêm tentando, ao longo dos anos, identificar fatores de risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais no carcinoma de

pênis (ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996b). HALL et al. (1998), estudando espessura tumoral, observaram que aqueles tumores com mais de 5mm de espessura, apresentavam uma incidência aumentada de metástases linfonodais. LOPES et al. (1996b), CAMPOS et al. (2006), mostraram significância em tumores de até 5mm como mais associados à metástases em linfonodos. A casuística obtida neste estudo, não apresentou significância estatística para a espessura tumoral ($p= 0,084$) como preditor de metástases linfonodais.

Analizando invasão linfática e vascular pelo tumor, estudos mostram que essas variáveis são preditoras de metástases linfonodais, tanto na análise univariada, quanto na multivariada (LOPES et al. 1996b; FRALEY et al. 1989; SLATON et al. 2001). LOPES et al. (1996b), além de concluir que a presença desses êmbolos tumorais são indicadores significativos de risco para metástases linfonodais tanto na análise univariada, quanto na multivariada, atribuíram um risco de disseminação da doença para linfonodos inguinais de 63,5% para pacientes com êmbolos tumorais e de 30,6% para aqueles sem sinais patológicos de embolização tumoral. Inclusive, até propuseram na época, uma mudança no estadiamento TNM. Corroborando com a literatura, esta casuística apresentou invasão vascular com significância na análise univariada ($p=0,001$), enquanto a invasão linfática com significância na univariada ($p=0,001$) e na multivariada ($RR=5,68$; IC 95% [2,8-11,7]) como fatores prognósticos no desenvolvimento de metástase linfonodais.

Em relação ao grau de diferenciação histológica do tumor, estudos tem demonstrado que quanto menos diferenciado é o tumor, mais metástases linfonodais ele apresenta e consequentemente, pior sobrevida quando comparados àqueles bem diferenciados (ORNELLAS et al. 1994; SLATON et al. 2001; SRINIVAS et al. 1987; SOLSONA et al. 1992; HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994). Demonstra-se nesse estudo, uma significância estatística na análise univariada ($p=0,001$) e multivariada (RR-24,26; IC 95% [3,2-190,8]) do grau de diferenciação tumoral como preditor de metástases linfonodais.

SOLSONA et al. (2001), mostrando que o risco de metástases linfonodais para tumores de baixo grau ou bem diferenciados foi de 15x, enquanto para os tumores de alto grau ou indiferenciados foi de 75x.

A correlação entre o local de invasão tumoral e a metástase linfonodal vem sendo mostrado na literatura ao longo dos anos (HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994; VILLAVICENCIO et al. 1997; PIZZOCARO et al. 1997; SLATON et al. 2001). Nessa série, invasão dos corpos cavernosos e invasão uretral, demonstraram ser preditores de risco para metástase linfonodal com ($p=0,01$) e ($p=0,01$), respectivamente na análise univariada. Num outro trabalho, FICARRA et al. (2005), mostraram também a importância da invasão uretral ($p<0,01$) e desta vez, a invasão do corpo esponjoso ($p<0,01$) como fortes preditores no envolvimento linfonodal no carcinoma peniano.

Portanto, nomogramas baseados em fatores anatomopatológicos como: estadiamento linfonodal, tamanho do tumor, grau de diferenciação

tumoral, espessura do tumor, padrão de invasão, infiltração do corpo esponjoso, invasão do corpo cavernoso, invasão uretral e presença de embolização vascular e linfática do tumor, tem sido propostos com o objetivo de prognosticar o câncer de pênis e analisar a sobrevida câncer específica (FICARRA et al. 2006; KATTAN et al. 2006).

Em relação aos aspectos cirúrgicos no manejo do paciente portador de carcinoma peniano, nossa casuística apresentou 57,5% de amputação parcial e 35,9% de amputação total, com apenas 6,6% de ressecção local, no que se refere ao tratamento do tumor primário. Obtivemos 93,4% de tratamento ressectivo radical, enquanto apenas 6,6% de tratamento conservador. Esses dados coincidem com a maioria dos trabalhos na literatura (FRALEY et al. 1989; LOPES et al. 1996b; FICARRA et al. 2006), nos quais as amputações são opções iniciais, e muitas vezes únicas de tratamento do tumor primário. Por outro lado, vale ressaltar, a importância de técnicas conservadoras, atualmente, cada vez mais realizadas (KAYES et al. 2007; OZSAHIN et al. 2006; MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007), e cujas vantagens são a preservação funcional e estética do membro, sem menosprezar o princípio fundamental da cirurgia oncológica que é o da segurança e o da curabilidade da doença. É importante lembrar contudo, que nos pacientes tratados com técnicas conservadoras, o seguimento do mesmo, deve ser cuidadoso e bem protocolado, evitando os altos índices de recidiva seja ela local e/ou regional existentes (LONT et al. 2006). Nessa série a recorrência locoregional ocorreu em 56 casos (16,8%) e à distância

em 11 casos (3,4%). Em outros 8 casos (2,3%), a recorrência foi locoregional e à distância.

Os altos índices de falsos positivos e de falsos negativos ao exame clínico, além da inexistência de métodos diagnósticos não invasivos, sensíveis e/ou específicos na prática clínica, com o objetivo de avaliar o comprometimento metastático dos linfonodos, tem justificado a realização de linfadenectomias de princípio ou profiláticas ou precoces no manejo do paciente após tratamento do tumor primário (CATALONA 1980; JOHNSON e LO 1984; MCDOUGAL et al. 1986; FRALEY et al. 1989; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996b; GUIMARÃES et al. 2003). Nessa série, foram realizadas linfadenectomias em 150 pacientes (45%), sendo destas, 53 linfadenectomias inguinais (15,9%) e 97 casos de linfadenectomias ílio-inguinais (29,1%). Trata-se de uma casuística grande, com um período de seguimento extenso, e ao longo deste período, observamos dois momentos distintos: um mais antigo, onde a maioria desses pacientes após o diagnóstico, foram submetidos ao tratamento do tumor primário e à linfadenectomia de princípio num só tempo cirúrgico. E o momento atual, onde os pacientes, após excisão do tumor primário, fazem uso de antibiótico por 4-6 semanas e após nova avaliação da região inguinal com correlação do anatomopatológico do tumor excisado, são submetidos ou não à linfadenectomia.

Quando adota-se a linfadenectomia por princípio, haverá um numero maior de linfadenectomias desnecessárias, submetendo esses pacientes a altas taxas de morbidade (CATALONA 1980; HORENBLAS et al. 1991). A

técnica clássica da linfadenectomia não é isenta de complicações (ORNELLAS et al. 1991), podendo chegar à 70% (LOPES 1995). Na literatura o índice médio de complicações relatadas está em torno de 60% (SKINNER et al. 1972; KAMAT et al. 1993). As séries contemporâneas apresentam índices menores de complicações, em torno de 50%, a partir de adequados cuidados técnicos durante a cirurgia e no pós operatório (NELSON et al. 2004; BEVAN-THOMAS et al. 2002). Nessa série, dos 150 pacientes (45%) submetidos à linfadenectomia, 120 pacientes (80,0%) apresentaram complicações isoladas ou associadas. Destas, a mais freqüente isoladamente foi o linfedema representando 12 casos (8,2%), seguido pela deiscência com 9 casos (5,8%).

Ao longo dos anos, já sabendo da baixa sensibilidade da punção por agulha fina dos linfonodos suspeitos para a avaliação locoregional e valorizando apenas os resultados positivos (HORENBLAS et al. 1991; BURGERS et al. 1992), esforços com o objetivo de se reduzir morbidade relacionada à linfadenectomia, resultaram desde procedimentos menos agressivos, através da avaliação e biópsia do LS descrita por CABANAS (1977), a técnicas mais aperfeiçoadas que consistiam na análise dinâmica dos linfonodos utilizando a linfocintografia e o gama-probe (HORENBLAS et al. 2000; LONT et al. 2003; KROON et al. 2005), possibilitando assim, uma dissecação regional. Ou até mesmo, procedimentos mais regrados, muitas vezes reduzindo a área a ser dissecada (linfadenectomia modificada), como fora proposto por CATALONA (1988), ganhando aceitação de alguns grupos (D'ANCONA et al. 2004). Porém, tais métodos não se tornaram

confiáveis pelo alto índice de falso-negativo, tanto para o LS (PERINETTI et al. 1980; WESPER et al. 1986), quanto para as biópsias linfonodais utilizando a linfocintografia e o gama-probe (TANIS et al. 2002), com resultados falso-negativos de até 22% e com sensibilidade de 80% para o método. A linfadenectomia modificada ou limitada deve ser vista com cuidado, pois algumas vezes o linfonodo metastático pode estar situado fora da área da dissecação (LOPES et al. 1996a).

Recentemente foi descrita a aplicação da ressonância magnética nuclear (RMN) com contraste paramagnético (nanopartículas de ferro) na identificação pré-operatória de comprometimento linfonodal em pacientes portadores de carcinoma peniano. Apesar de ser um estudo inicial, os resultados foram animadores com taxa de detecção de 90% (TABATABAEI et al. 2005).

5.2 ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

Como os fatores clínicos ou anatomopatológicos isoladamente não tem sido capazes de prever o risco de metástase linfonodal nos pacientes portadores de CEC de pênis, nem na época do diagnóstico bem como no seu seguimento, novos estudos associando esses fatores clássicos já estudados, com elementos da biologia molecular, constituem hoje uma opção na tentativa de selecionar pacientes com maior risco de metástases linfonodais, instituindo nestes, o tratamento de princípio, enquanto naqueles

com baixo risco para metástases, o tratamento expectante, mantendo-se seguimento cuidadoso e diminuindo assim, a morbidade terapêutica.

Diversos marcadores imunoistoquímicos foram estudados no carcinoma peniano, buscando, em associação com fatores clássicos já estudados, otimizar a seleção de pacientes candidatos à linfadenectomia, dividindo-os em pacientes com maior e menor risco de desenvolver metástases linfonodais (LOPES et al. 2002; GOLIJANIN et al. 2004; CAMPOS et al. 2006; SOARES et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2007). Por consequência, somente aqueles de alto risco seriam submetidos à linfadenectomia, diminuindo expressivamente o índice de morbidade deste procedimento

Inovações metodológicas foram instituídas na realização desses novos estudos. Diferentemente dos outros estudos em carcinoma de pênis, nessa série, a análise estatística foi realizada a partir da confecção do TMA. Essa nova tecnologia, possibilita a análise de um número expressivo de casos, utilizando poucas lâminas e principalmente, mantendo condições de concentração dos reagentes, temperatura, tempo de incubação e lavagem, constantes e exatamente iguais para todos os casos do estudo, dando uma qualidade melhor na amostra a ser analisada, ou seja, todo caso a ser estudado é tratado e preparado de maneira idêntica, dando uma uniformidade e homogeneidade à amostra (RIMM et al. 2001). Além disso, o volume tumoral pequeno no TMA, anteriormente criticado, por não ser representativo do tumor, atualmente não representa mais um problema na medida em que estudos estão sendo publicados, desmistificando esta idéia

e provando que mesmo uma amostra pequena é representativa e pode ser analisada estatisticamente com a mesma acurácia de amostras analisadas pelos métodos convencionais (CAMP et al. 2000; MUCCI et al. 2000).

A escolha da ciclina D1 como marcador tumoral no carcinoma peniano foi estimulada por vários estudos mostrarem a importância desse marcador em tumores diversos no homem (BILALOVIC et al. 2005; YU et al. 2005; CHEN et al. 2005; CHUNG et al. 2005; KNOPP et al. 2005), sua interação bem estabelecida na regulação do ciclo celular em células eucarióticas (JOHNSON e WALKER 1999) e principalmente, por ascender a possibilidade de encontrar um marcador significativo, seja isolado ou em conjunto com outros marcadores já estudados, para melhor selecionar pacientes com maior risco de metástases linfonodais.

Apesar de extensamente investigado em vários tumores, a ciclina D1 foi pouco avaliada no carcinoma peniano. PAPADOPOULOS et al. (2007), avaliaram a expressão da ciclina D1 e do Ki-67 em 21 casos de CEC de pênis e em 14 casos de lesões pré malignas do pênis. Analisando apenas os casos de carcinoma peniano (21 casos), objeto do presente estudo, os autores encontraram uma hiperexpressão desta ciclina em 13 dos 21 casos (61,9%), a partir da categorização dos grupos (grupos de hipo e hiperexpressão), a partir de um ponto de corte de 10%. Encontraram uma associação entre expressão da ciclina D1 e a diferenciação do grau tumoral com $p=0,07$ e uma associação da expressão da ciclina D1 com o nível de invasão tumoral de apenas $p=0,50$. Concluíram com esse trabalho, que a

hiperexpressão da ciclina D1 pode ser utilizada como fator de prognóstico desfavorável na sobrevida de pacientes com carcinoma de pênis.

No presente estudo entretanto, trabalhamos com uma casuística extensa de pacientes com diagnóstico de carcinoma peniano ao longo de um período grande de tempo (54 anos), e todos eles com correlação anátomo-clínica. Optamos pela realização do estudo utilizando o Tissue Microarray, diminuindo o gasto com material, garantindo uma mesma qualidade na confecção das lâminas do “array” caso a caso e principalmente, garantindo uma análise acurada da amostra através de áreas tumorais representativas de todos os 333 casos em apenas 4 lâminas.

Metodologicamente, por tratar-se de um estudo retrospectivo com uma série histórica grande, optamos por avaliar a qualidade da imunorreatividade de cada caso, utilizando marcadores específicos para esse fim (citoceratina AE1/AE3 e VIMENTINA). Obtivemos apenas uma imunorreatividade baixa em 2 casos que foram previamente descartados. Isso nos deu uma segurança maior e uma tranquilidade para realizar o ensaio desejado com certeza de um resultado com qualidade.

O mais difícil foi decidir o ponto de corte utilizado e como os grupos de estudo iriam ser agrupados. Devido ao pouco número de estudos de ciclina D1 e carcinoma peniano, analisamos como foram definidos os pontos de corte em estudos prévios que utilizaram a ciclina D1 em outros tipos de tumores. A maioria dos estudos, utilizou o método não automatizado para classificar a positividade nuclear para a ciclina D1. Não houve uma padronização nessa classificação, sendo que cada estudo determinou uma

forma de classificação aleatória para sua casuística. CHEN et al. (2005), estudando a ciclina D1 em câncer ovariano, definiu 10% como seu ponto de corte e definiu o grupo negativo ($\leq 10\%$) e o grupo positivo ($>10\%$). Num estudo da ciclina D1 e carcinoma de mama, optou-se por intervalos, definindo o grupo de fraca expressão imunoistoquímica para a ciclina D1 ($<10\%$), moderada expressão (10-50%) e forte expressão ($>50\%$) (BILALOVIC et al. 2005). Num estudo da ciclina D1 e tumores endócrinos do pâncreas, novos intervalos foram definidos: fraca expressão imunoistoquímica para a ciclina D1 ($<25\%$), moderada expressão (25-50%) e forte expressão ($>50\%$) (CHUNG et al. 2005). Na análise da ciclina D1 e o carcinoma de vulva foi definido como ponto de corte 5%, sendo o grupo de baixa expressão ($\leq 5\%$) e o grupo de alta expressão ($>5\%$) (KNOPP et al. 2005). Somente o estudo da ciclina D1 em carcinoma escamocelular de orofaringe, adotou o AQUA (automated in situ quantitative), baseando-se numa escala de expressão de intensidade de pixel variando de 1-255 por área tumoral previamente definida (YU et al. 2005). Nessa série, o ponto de corte foi de 5%, sendo o grupo negativo ($\leq 5\%$) e o grupo positivo ($>5\%$), porém, como a análise foi feita baseada no “tissue microarray”, para obtermos uma amostra representativa de cada caso, foi analisada quatro áreas distintas do mesmo tumor para cada caso e só a partir daí, através de médias simples, os casos foram categorizados nos grupos definidos acima. Como não existe um padrão para este tipo de estudo, acreditamos ser este um bom método inicial. A medida em que novos estudos imunohistoquímicos

em pênis utilizando o TMA, forem publicados, talvez consigamos atingir um aperfeiçoamento dessa metodologia.

A imunoistoquímica no presente estudo, resultou em uma expressão nuclear da ciclina D1 positiva em 168 casos (50,5%) e negativa em 165 casos (49,5%). A princípio, fica claro a complexidade da análise, na qual, quase na metade dos casos estudados de pacientes com câncer de pênis, a ciclina D1 apresentou expressão negativa, contrariando o processo da tumorigênese, no qual, necessariamente deve haver divisão celular descontrolada com multiplicação celular, e como a ciclina D1 está envolvida na regulação do ciclo celular, a mesma deveria estar hiperexpressa na grande maioria dessas células tumorais (PAPADOPOULOS et al. 2007). Com o resultado imunoistoquímico apresentado nessa série, fica claro que a expressão da ciclina D1 por si só, sem a correlação com outros fatores clássicos já estudados (clínicos, demográficos e anatomopatológicos), não pode ser considerada fator de mau prognóstico no carcinoma peniano, diferindo da literatura (PAPADOPOULOS et al. 2007).

No presente estudo a imonoreatividade da ciclina D1 apresentou correlação com as variáveis clínicas e demográficas: realização de postectomia ($p=0,001$) e tempo de evolução ($p=0,021$). Apresentou correlação com as seguintes variáveis anatomopatológicas: infiltração uretral ($p=0,005$), infiltração de corpos cavernosos ($p=0,012$), embolização venosa ($p=0,033$) e diferenciação histológica do tumor ($p=0,037$) na análise univariada.

Apenas o grau de diferenciação do tumor foi fator independente para a expressão da ciclina D1 no modelo multivariado com as variáveis selecionadas.

Nessa série não foi encontrada relação significativa estatisticamente da expressão da ciclina D1 com a presença de metástases linfonodais, nem tampouco com o risco de recidiva ou de óbito.

5.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA

Na correlação das variáveis clínicas com a sobrevida livre de doença, o estadiamento clínico N ($p=0,001$) e o estadiamento clínico T ($p=0,001$) apresentaram significância estatística na análise univariada. GUIMARÃES et al. (2003), ressaltou a importância do estadio clínico N como variável importante.

Na correlação com variáveis anatomopatológicas com a sobrevida livre de doença, o grau de diferenciação tumoral ($p=0,001$), espessura do tumor ($p=0,001$), embolização venosa ($p=0,001$), permeação linfática ($p=0,001$), metástase linfonodal ($p=0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p=0,003$) e infiltração uretral ($p=0,005$), apresentaram significância estatística, corroborando com a literatura (LOPES et al. 1996b; GUIMARÃES et al. 2003).

A imunoexpressão da ciclina D1 não foi estatisticamente significativa para a sobrevida livre de doença nem na análise univariada nem na multivariada.

As variáveis que permaneceram como independentes para a sobrevida livre de doença em 5 anos foram a metástase linfonodal (RR = 3,4; IC 95% [(2,0 – 5,6)], o grau de diferenciação tumoral (RR = 8,4; IC 95% [(2,0 – 35,2)], a espessura do tumor (RR = 3,3; IC 95% [(1,5 – 7,3)] e o estadiamento clínico T (RR = 1,8; IC 95% [(1,1 – 3,0)]).

Na correlação das variáveis clínicas com a sobrevida global, idade (p=0,001), estadiamento clínico N (p=0,001) e estadiamento clínico T (p=0,021) foram as de maior importância estatística.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida global, encontram-se: embolização venosa (p=0,001), permeação linfática (p=0,001), metástase linfonodal (p=0,001), grau de diferenciação tumoral (p=0,001), espessura tumoral (p=0,034), infiltração de corpo cavernoso (p=0,041) e infiltração uretral (p=0,045).

A imunorreatividade da ciclina D1 não apresentou significância estatística em relação à sobrevida global nem na análise univariada, nem na multivariada.

Por sua vez, as variáveis independentes para o risco de óbito foram presença de metástase linfonodal e permeação linfática.

Na correlação das variáveis clínicas com a sobrevida câncer específica, o estadiamento clínico N (p=0,001) e o estadiamento clínico T (p=0,020), representaram significância estatística.

Na correlação com variáveis anatomopatológicas com a sobrevida câncer específica, influenciaram significativamente o grau de diferenciação tumoral (p=0,001), permeação linfática (p=0,001), metástase linfonodal

($p=0,001$), embolização venosa ($p=0,003$), espessura do tumor ($p=0,013$) e infiltração de corpo cavernoso ($p=0,039$)

A imunorreatividade da ciclina D1 não apresentou significância estatística para a sobrevida câncer específica

Das variáveis selecionadas, a metástase linfonodal ($RR = 5,2$; IC 95% $[(3,0 - 8,9)]$) e a espessura do tumor ($RR = 2,2$; IC 95% $[(1,1 - 4,6)]$) foram fatores independentes de risco para óbito por câncer de pênis.

Portanto, fica claro e bem estabelecido após análise dessa casuística, que a presença de metástase linfonodal permanece como o principal fator de prognóstico no carcinoma peniano, corroborando com a literatura (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977; NARAYANA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996a), aparecendo como fator independente em todas as sobrevidas analisadas.

Quando da correlação específica entre a presença e a ausência de metástases linfonodais com a sobrevida, ao longo dos anos, percentualmente, os dados são ainda mais evidentes. SUFRIN e HUBEN (1987), considerando linfonodos metastáticos e não metastáticos encontraram uma sobrevida global em 5 anos de 27,5% e 66,2%, respectivamente. HORENBLAS e VAN TITEREN (1994), demonstraram taxas de sobrevida de 50% e 93%, em 5 anos para linfonodos metastáticos e não metastáticos respectivamente. Nessa série, para a sobrevida global, as taxas obtidas foram de 43,3% e 80,9% em 5 anos e 30,7% e 63,9% em 10 anos para pacientes com e sem metástases linfonodais respectivamente.

As sobrevidas livre de doença e câncer específica, em 5 anos, resultaram em taxas de 41,8% e 86,2% e de 54,0% e 90,4% com e sem metástases linfonodais respectivamente.

Por outro lado, os marcadores imunohistoquímicos até hoje estudados no carcinoma peniano, não tem demonstrado nem sensibilidade, nem especificidade suficientes como meios de prognosticar a doença, e estão longe de ser os marcadores ideais tanto para diagnóstico, quanto para seleção de pacientes para a linfadenectomia ou até, para seguimento desses pacientes tratados.

A ciclina D1, demonstrou ser um marcador factível na prática clínica, apresentando correlações tanto clínicas quanto anatomopatológicas significantes estatisticamente para o carcinoma peniano, contudo sem importância prognostica ao ser utilizada isoladamente. Talvez, em conjunto com as outras ciclinas, possa ter valor prognóstico importante.

O objetivo, a partir de agora, já que existem nomogramas clínicos e anatomopatológicos validados para prognóstico do carcinoma peniano (FICARRA et al. 2005; KATTAN et al. 2006), é o de criar novos nomogramas após análise minuciosa de todos os marcadores moleculares estudados ao longo dos anos, desenvolvendo talvez, um painel imunoistoquímico com marcadores de maior significância estatística no prognóstico do carcinoma peniano. Com isso, a associação dos nomogramas hoje existentes com estes novos nomogramas, se constituirão em uma nova ferramenta que selecionará o paciente ideal para a linfadenectomia radical, diminuindo a

morbidade do procedimento, sem contudo, diminuir o percentual de cura da doença.

6 CONCLUSÕES

- A expressão da ciclina D1 apresentou correlação estatisticamente significativa com infiltração uretral, infiltração de corpos cavernosos, embolização venosa e grau de diferenciação tumoral na análise univariada, Na análise multivariada, o grau de diferenciação tumoral foi a única variável estatisticamente significativa.
- Não existe associação da expressão da ciclina D1 com a ocorrência de metástases linfonodais, nem com a sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida câncer específica no carcinoma peniano.
- Grau de diferenciação tumoral e permeação linfática, apresentaram nesse estudo, correlação com a presença de metástase linfonodal, tanto na análise univariada, quanto na multivariada.
- A presença de metástase linfonodal foi fator independente quando avaliada para a sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida câncer específica no carcinoma peniano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Adeyolu AB, Thornhill J, Corr J, Grainger R, McDermott TE, Butler M. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis and implications for management. **Br J Urol** 1997; 80:937-9.

Antoneli CB, Novaes PE, Alves AC, Cardoso H, Lopes A. Rhabdomyosarcoma of the penis in a 15-month-old boy. **J Urol** 1998; 160:2200-1.

Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5168-177.

Barbieri F, Cagnoli M, Ragni N, et al. Increased cyclin D1 expression is associated with features of malignancy and disease recurrence in ovarian tumors. **Clin Cancer Res** 1999; 5:1837-42.

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 M.D. Anderson Cancer Center experience. **J Urol** 2002; 167:1638-42.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of

82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001; 91:2315-21.

Bilalovic N, Vranic S, Basic H, Tatarevic A, Selak I. Immunohistochemical evaluation of cyclin D1 in breast cancer. **Croat Med J** 2005; 46:382-8.

Biliran H Jr., Wang Y, Banerjee S, et al. Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. **Clin Cancer Res** 2005; 11: 6075-86.

Brinton LA, Juan-Yao L, Shou-de R, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Broker TR. Structure and genetic expression of papillomaviruses. **Obstet Gynecol Clin North Am** 1987; 14:329-48.

Brumini R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos**. 1976-80. Rio de Janeiro. Campanha Nacional de Combate ao Câncer – Ministério da Saúde, 1982.

Buddington WT, Kickham CJ, Smith WE. An assessment of malignant disease of the penis. **J Urol** 1963; 89:442-9.

Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer: clinical presentation, diagnosis and staging. **Urol Clin North Am** 1992; 16:247-56.

Cabanas RM. An approach for the treatment of the 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.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest** 2000; 80:1943-49.

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; 140:836.

Chen CH, Shen J, Lee WJ, Chow SN. Overexpression of cyclin D1 and c-Myc gene products in human primary epithelial ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2005; 15:878-83.

Chung DC, Brown SB, Graeme-Cook F, et al. Overexpression of cyclin D1 occurs frequently in human pancreatic endocrine tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 85:4373-8.

Coblentz TR, Theodorescu D. Morbidity of modified prophylactic inguinal lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2002; 168:1386-9.

Cunha RP, Viana G, Lima AO, Bravo A, Branco J, Couto A. Carcinoma epidermóide do pênis com metástase inguinal bilateral em crianças de 12 anos de idade. **J Br Urol** 1981; 7:147-8.

Cupp MR, Malek RS, Goellner JR, Smith TF, Espy MJ. The detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis. **J Urol** 1995; 154:1024-9.

D'ancona CAL, Lucena RG, Querne FAO, Martins MHT, Denardi F, Netto JR NR. Long-term follow up of penile carcinoma treated with penectomy and bilateral modified inguinal lymphadenectomy. **J Urol** 2004; 172:498-501.

Das S. Penile amputations for the management of primary carcinoma of the penis. **Urol Clin North Am** 1992; 19(2):277-82.

Dekernion JB, Tynberg P, Persky L, Fegen JP. Carcinoma of the penis. **Cancer** 1973; 32:1256-62.

Dennis EJ, Heins HC, Latham E, Mciver FA, Pratt-Thomas HR. The carcinogenic effect of human smegma: an experimental study. I. Preliminary report. **Cancer** 1956; 9:671-80.

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

Dhar KK, Branigan K, Parkes J, et al. Expression and subcellular localization of cyclin D1 protein in epithelial ovarian tumor cells. **Br J Cancer** 1999; 81:1174-81.

Dillner J, Arbyn M, Dillner L. Translational mini-review series on vaccines: Monitoring of human papillomavirus vaccination. **Clin Exp Immunol** 2007; 148:199-207.

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

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

Ficarra V, Zattoni F, Cunico SC, et al. Lymphatic and vascular embolizations are independent predictive variables of inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis: Grupo Uro-Oncológico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer data base data. **Cancer** 2005; 103:2507-16.

Fishman M, Friedman HF, Stewart HL. Local effect of repeated application of 3,4-benzpyrene and of smegma to the vagina and cervix of mice. **J Natl Cancer Inst** 1942; 2:361-73.

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

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

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

Frisch M, Friis S, Kjaer SK, Melbye KM. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population (Denmark 1943-90). **BMJ** 1995; 311:1471.

Gentil FC, Lopes A, Epifânio ITN, Cavalcante SF, Souza e Sá AO. Esvaziamento inguino-ilíaco: técnica e tática operatória. **Acta Oncol Bras** 1986; 6:83-86.

Gloeckler-Ries LA, Hankey BF, Edwards BK. Cancer **Statistic Review 1973-1987**. Bethesda: National Institute of Health; 1990. (National Institute of Health Publication nº 90-2789).

Golijanin D, Tan JY, Kazior A. Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1024-31.

Gradishar WJ. The future of breast cancer: the role of prognostic factors. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 9: S17-S26.

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

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. A 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 MLO, Fonseca, PF, Werneck IC, Soares FA, Lopes A. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology** 2007, 70:137-42.

Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and traditional pathologic variables in invasive penile carcinoma assessment of prognostic significance. **Urology** 1998; 52:11-6.

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

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behavior? **Br Med J** 1987; 1995:1306-8.

Hermanek P, Sobin LH. **TNM: Classification of malignant tumors**. 4th ed. rev. Berlin: Springer Verlag; 1987. Penis; p.130-2.

Herr HW. Surgery of penile and urethral carcinoma. In: Walsh PC; Retik AB; Stamey TA; Vaughan ED, editors. **Campbell's urology**. 6th ed. Philadelphia, W. B. Saunders; 1992. p.3073-89.

Horenblas S, Van Tinteren H, Delemarre JFM, et al. 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.

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

Horenblas S, van Tinteren H. Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. **J Urol** 1994; 151:1239-43.

Horenblas S, Jansen L, Meinhardt W, et al. Detection of occult metastasis in squamous cell carcinoma of the penis using a dynamic sentinel node procedure. **J Urol** 2000; 163:1000-4.

Hung WC, Chai CY, Huang JS, Chuang LY. Expression of cyclin D1 and c-Ki-ras gene product in human epithelial ovarian tumors. **Hum Pathol** 1996; 27:1324-8.

Jackson SM. The treatment of carcinoma of the penis. **Br J Surg** 1966; 53:33-5.

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

Johnson DE, Lo RK. Management of regional lymph nodes in penile carcinoma: five-year results following therapeutic groin dissections. **Urology** 1984; 24:308-11.

Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1999; 39:295-312.

Kamat MR, Kulkarni JN, Tongaonkar HB. Carcinoma of the penis: the Indian experience. **J Surg Oncol** 1993; 52: 50-5.

Kattan MW, Ficarra V, Artibani W, et al. Nomogram predictive of cancer specific survival in patients undergoing partial or total amputation for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:2103-8.

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** 2007; 51:1313-9.

Knopp S, Bjørgea T, Neslanda JM, Tropeb C, Holm R. Cyclins D1, D3, E, and A in vulvar carcinoma patients. **Gynecol Oncol** 2005; 97:733-9.

Koljonen V, Tukiainen E, Haglund C, Hling TB. Expression of cyclin a in Merkel cell carcinoma. **APMIS** 2004; 112:39-44.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-47.

Kroon BK, Horenblas S, Deurloo EE, Nieweg OE, Teertstra HJ. Ultrasonography-guided fine-needle aspiration cytology before sentinel node biopsy in patients with penile carcinoma. **BJU Int** 2005; 95:517-21.

Lewin B. **Gene VII**. Porto Alegre: Arte Med; 2001. Ciclo celular e regulação do crescimento; p.799-836.

Licklider S. Jewish penile carcinoma. **J Urol** 1961; 86:98.

Lont AP, Gallee MPW, Meinhardt W, van Tinteren H, Horenblas S. Penis conserving treatment for t1 and t2 penile carcinoma: clinical implications of a local recurrence. **J Urol** 2006; 176:575-80.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Oncologia cirúrgica. **Acta Oncol** 1993; 13:2-3.

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

Lopes A. **Fatores clínicos e anatomopatológicos envolvidos no risco de metástases linfonodais e no prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma de pênis tratados por cirurgia**. São Paulo; 1995. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

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

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

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

Lopes A, Bezerra AL, Pinto CAL, Serrano SV, Abdon de Mello C, 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.

Machado MT, Molina WR Jr, Tavares A, Forseto PH Jr, Juliano RV, Wroclawski ER: Comparative study between videoendoscopic inguinal lymphadenectomy (VEIL) and standard open procedure for penile câncer: preliminary surgical and oncological results. **J Urol** 2005; 173:226.

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

Masciullo V, Scambia G, Marone M, et al. Altered expression of cyclin D1 and CDK-4 genes in ovarian carcinomas. **Int J Cancer** 1997; 74:390-5.

McDougal WS, Kirchner FK Jr, Edwards RH, Killion LT. Treatment of carcinoma of the penis: the case for primary lymphadenectomy. **J Urol** 1986; 136:38-41.

Meijer RP, Boon TA, van Venrooij GEPM, Wijburg CJ. Long-term follow-up after laser therapy for penile carcinoma. **Urology** 2007; 69:759-62.

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.

Mohs FE, Snow SN, Larson PO. Mohs micrographic surgery for penile tumors. **Urol Clin North Am** 1992; 19:291-304.

Mucci NR, Akdas G, Manely S, et al Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. **Hum Pathol** 2000; 31:406-14.

Murray A, Evan G, Hunt J, Nunes P. The cell-division cycle. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Ralf M, Roberts K, Watson JD, editors. **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. New York: Garland; 1994. p.863-910.

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

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

Nardi AC, Glina S, Favorito LA. I Estudo epidemiológico sobre câncer de pênis no Brasil. **Int Braz J Urol** 2007; 33:1-7.

Nelson BA, Cookson MS, Smith JA Jr, Chang SS. Complications of inguinal and pelvic lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis: a contemporary series. **J Urol** 2004; 172:494-497.

Nocito A, Kononen J, Kalioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. **Int J Cancer** 2001; 94:1-5.

Odland PB. Organ-sparing dermatologic surgical approach to cancer of the penis. In: Raghavan D, Scher HI, Leibel AS, Lnge PH, editors. **Principles and pratice of genitourinary oncology**. Philadelphia: Lippinocott-Raven; 1997. p.943-8.

Ornellas AA, Seixas AL, de Moraes JR. Analyses of 200 lymphadenectomies in patients with penile carcinoma. **J Urol** 1991; 146:330-2.

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

Ozsahin M, Jichlinski P, Weber DC, et al. Treatment of penile carcinoma: to cut or not to cut? **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 66:674-9.

Papadopoulos O, Betsi E, Tsakistou G, et al. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. **Anticancer Res** 2007; 27:2167-74.

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

Perinetti E, Crane DB, Catalona WJ. Unreliability of sentinel lymph node biopsy for staging of penile carcinoma. **J Urol** 1980; 124:734-5.

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

Pizzocaro G, Piva L, Bandieramonte G, Tana S. Up-to-date management of carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:5-15.

Pompeu ACL. **Linfadenectomia inguinal estagiada em câncer de pênis: avaliação prospectiva de 50 pacientes**. São Paulo, 1993. [Tese de Livre-Docência-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

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

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

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. **Exp Mol Pathol** 2001; 703:255-64.

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

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

Rotolo JE, Lynch JH. Penile cancer: curable with early detection **Hosp Pract** 1991; 26:131-8.

Rudolph P, Uhling HK, Alm P. Differential prognostic impact of the cyclins e and b in premenopausal and postmenopausal women with lymphnode-negative breast cancer. **Int J Cancer** 2003; 105:674–80.

Schellhammer PF, Jordan GH, Schlossberg SM. Tumors of the penis. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED Jr, editors. **Campbell's urology**. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1992. p.1264-98.

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

Schuessler WW, Vancaillie TG, Reich H, Griffith DP. Transperitoneal endosurgical lymphadenectomy in patients with localized prostate cancer. **J Urol** 1991; 145:988-91.

Shabad AL. Some aspects of etiology and prevention of penile cancer. **J Urol** 1964; 92:696-702.

Skinner DG, Leadbetter WF, Kelley SB. The surgical management of squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 1972; 107:273-7.

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

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

Solsona E, Iborra I, Ricós JV, Monrós JL, Dumont R, Casanova J, Calabuig C. Corpus cavernosum invasion and tumor grade in the prediction of lymph node condition in penile carcinoma. **Eur Urol** 1992; 22:115-8.

Solsona E, Iborra I, Rubio J, Casnova JL, Ricós JV, Calabuig C. Prospective validation of the association of local tumor stage and grades as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal nodes. **J Urol** 2001; 165:1506-9.

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

Staubitz WJ, Lent MH, Oberkircher OJ. Carcinoma of the penis. **Cancer** 1955; 8:371-8.

Sufrin G, Huben R. **Adult and pediatric urology**. 2nd ed. Chicago: Year Book Medical; 1987. Benignant and malignant lesions of the penis; p.1462-3.

Sui L, Tokuda M, Ohno M, Hatase O, Hando T. The concurrent expression of p27(kip1) and cyclin D1 in epithelial ovarian tumors. **Gynecol Oncol** 1999; 73:202-9.

Tabatabaei S, Harisinghani M, McDougal WS. Regional lymph node staging using lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10 in patients with penile cancer. **J Urol** 2005; 174:923-7.

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

Tewari M, Kumar¹ M, Shukla HS. Nd:Yag laser treatment of early stage carcinoma of the penis preserves form and function of penis. **Asian J Surg** 2007; 30:126-30.

Tobias-Machado M, Tavares A, Ornellas AA, Molina WR, Jr, Juliano RV, Wroclawski ER. Vídeo endoscopic inguinal lymphadenectomy (VEIL): a new minimally invasive procedure for radical inguinal nodes management in penile cancer patients. **J Urol** 2007 (in press).

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

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

Villavicencio H, Rubio-Briones J, Regalado R, Chéchile G, Algaba F, Palou J. Grade, local stage and growth pattern as prognostic factors in carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:442-7.

Wajsman Z, Moore RH, Merrin CE, Murphy GP. Surgical treatment of penile cancer: a follow-up report. **Cancer** 1977; 40:1697-701.

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

Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, et al. Prevalence of papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. **Int J Cancer** 1992; 50: 694-701.

Worsley SD, Ponder BA, Davis BR. Overexpression of cyclin D1 in epithelial ovarian cancers. **Gynecol Oncol** 1997; 64:189-95.

Young MJ, Reda DJ, Waters WB. Penile carcinoma: a twenty-five-year experience. **Urology** 1991; 38:529-32.

Yu Z, Weinberger PM, Haffty BG, et al. Cyclin D1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1160-6.

Anexo 1 - Ficha de Levantamento de Dados

Projeto de Tese: Augusto Modesto de Souza Neto

RISCO DE METÁSTASE LINFONODAL EM CÂNCER DE PÊNIS x CICLINAS

01. Nº do estudo -
.....|_|_|_|_|
02. RG.....|_|_|_|_|_|_|_|_|_|
||_|_|
03. Data da admissão ____/____/____
...../____/____
04. Idade na admissão
(anos).....|_|_|_|
05. Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) outros (9) Ign
.....|_|_|
06. Raça : (1) Branca (2) Amarela (3) Negra (4) Ign
.....|_|_|
07. Sinais / Sintomas : (1) Ferida (2) Dor (3) Inflamação (4) Disúria
.....|_|_|
(5) Prurido (6) Outros (9) Ign.
08. Tempo de evolução (meses) : _____
.....|_|_|_|
09. Antecedentes venéreos: (0) Não (1) Sim.
.....|_|_|
10. Postectomia: (0) Não (1) Não relacionada (2) Relacionada (9) Ign
.....|_|_|
11. Situação à 1ª consulta : (1) Biopsiado (2) Amputado (3) Esvaziado
.....|_|_|
(4) Intacto (9) Ign.

12. Estadiamento cT: (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx
.....|_|
13. Estadiamento cN: (0) N0 (1)N1 (2)N2 (3)N3 (4)N4 (9)Nx
.....|_|
14. Estadiamento cM: (0) M0 (1)M1 (9)Mx
.....|_|
15. Data da amputação/ ressecção ____/____/____
.....____/____/____
16. Cirurgia: (0) Não (1) Amp. Parcial (2) Amp. Total (3) Exerese
.....|_|
(4) Postectomia.
17. Tipo de esvaziamento ganglionar: (0) Não (1) Inguinal (2) Inguino-ilíaco
.....|_|
(9) Ign.
18. Intenção do esvaziamento : (1) Princípio (2) Necessidade (9) Ign
.....|_|
19. Data do esvaziamento: ____/____/____
.....____/____/____
20. Complicações relacionadas à amputação: (0) Não (1) Infecção
.....|_|
(2) Deiscência (3) Estenose (4) Hemorragia (9) Ign
21. Complicações relacionadas ao esvaziamento:
.....|_|
(0)Não (1)Infecção (2) Deiscência (3) Hematoma (4) Necrose (5)
Linfedema
(6)Ruptura de vasos (9) Ign.
22. Número do AP :
.....|_|_|_|_|_|_|_|_|
23. Grau de Diferenciação: (1) Bem diferenciado (2) Mod. diferenciado
____.....|_|
(3)Pouco diferenciado (4)Não classificado (9)Ign.

24. Espessura do tumor : (1)Até 1mm (2) 1-5mm (3) >5mm (9) Ign.
.....|_|

25. Permeação linfática: (0)Não (1) Presente (9) Ign.
.....|_|

26. Embolização venosa: (0)Não (1) Presente (9) Ign.
.....|_|

27. Infiltração de corpos carvenosos: (0)Não (1)Presente (9)Ign
.....|_|

28. Infiltração da uretra : (0)Não (1)Presente (9)Ign
.....|_|

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

30. Alteração sugestiva de HPV (coilocotose): (1)Presente (2)Ausente (9) Ign.
.....|_|

31. Total de linfonodos examinados:
.....|_|_|

32. Total de linfonodos positivos:
.....|_|_|

33. Lateralidade dos linfonodos positivos: (1)Unilat. (2)Bilateral (9) Ign
.....|_|

34. Cadeia linfonodal positiva: (1)Inguinal (2) Inguinal + Ilíaco (3)Ilíaco (9)Ign
....|_|

35. Data da recidiva: ____/____/____
.....__/__/__

36. Local da recidiva: (0)Não (1)Coto (2)Regional (3)Pulmões (4)Ossos
.....|_|
(5) Fígado (6)outros (9)Ign.

37. Tratamento da recorrência; (0)Não (1)RHD (2)Local (3)Regional (4)Rxt
.....|_|

(5)Qt (6)Outro (9)Ign.

38. Data do ultimo seguimento: ____/____/____
.....__/__/__

39. Situação no seguimento: (1)Vivo s/ doença (2)Vivo com doença
_____.
(3)Óbito por câncer (4)Óbito por outra causa (5) Perdido de vista