

ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA FAMÍLIA ERBB NO CARCINOMA PENIANO

ALICE MUGLIA THOMAZ DA SILVA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares
Coorientador: Prof. Dr. Ademar Lopes**

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Alice Muglia Thomaz da

Estudo da expressão proteica da família ErbB no carcinoma peniano / Alice Muglia Thomaz da Silva – São Paulo, 2010.

87p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DE PÊNIS. 2. CARCINOMA
ESPINOCELULAR/epidemiologia. 3. RECEPTORES DOS FATORES
DE CRESCIMENTO/uso terapêutico. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA.

*“...scientific work must not be considered
from the point of view of the direct usefulness of it.
It must be done for itself, for the beauty of science,
and then there is always the chance that
a scientific discovery may become (...) a benefit for humanity.”*

Marie Curie (1867 - 1934), primeira cientista a ganhar duas vezes o Prêmio Nobel, a única a ganhar em duas áreas diferentes.

“Curiouser and Curiouser!” thought Alice.”

Lewis Carroll (from Alice in Wonderland)

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Magda, por estar sempre
ao meu lado e me amar incondicionalmente...*

*Ao meu pai, Olinto, pelo exemplo de vida, honestidade
e profissionalismo, e por todo seu incentivo e seu amor...*

*Ao meu amado irmão Henrique, pelo carinho,
companheirismo, amizade e paciência de sempre...*

Obrigada por existirem! Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar mais esta oportunidade e me abençoar a cada passo da caminhada nem sempre fácil;

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, não apenas pela orientação, mas por todas as palavras de força e incentivo, e por ter depositado em mim confiança necessária para a realização deste trabalho;

À minha eterna orientadora Prof. Dr^a. Antônio Elenir Amâncio de Oliveira, e a todo o laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP/UENF), por me terem ensinado o que é fazer ciência;

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, por disponibilizar as informações clínicas necessárias para a finalização do estudo;

Aos queridos Severino e Carlinhos pelo sorriso sempre amigo, depois de tantas idas e vindas com blocos e lâminas;

Aos amigos do laboratório de imunoistoquímica, Ivanildo Neves, Fátima e Simone, pela paciência e boa vontade na ajuda com os ensaios;

Ao amigo Dr. Rafael Malagoli Rocha, pela ajuda com as reações e interpretações da imunoistoquímica;

Ao Gustavo Cardoso Guimarães, pelo auxílio com os testes estatísticos;

À Dr^a. Isabela Werneck da Cunha, pela ajuda com as fotomicrografias;

À minha madrinha Lúcia, pela revisão ortográfica e por toda força e carinho;

À minha tia Miriam Magalhães, de fundamental importância no início da minha vida em São Paulo. Agradeço a presteza e o cuidado de sempre;

Ao Rondinele dos Reis Amâncio por ser paciente e incentivador, e por ter me ensinado a amar para a vida inteira... Sem você, tudo seria muito mais difícil;

À Amélia e João Amâncio, por terem sempre me acolhido com tanta doçura;

Aos amigos que, mesmo de longe, me deram a força necessária para seguir em frente. Anelise Peixoto, Dani Santana, Dani Pereira, Nana Soldati e Paula Cristina. Vocês são prova de que não há distâncias para amizades verdadeiras;

Aos amigos de perto, tão especiais, por terem tornado os meus dias menos cinzentos... Camila Adão, Eduardo Freitas, Giza Cortez, Losanges Lozano e, em especial, Renata Paschoalini, que foi literalmente colocada em meu caminho... Agradeço o carinho, os risos e os sorrisos!

À minha nova e tão querida amiga Mila Martins, pela amizade nos primeiros momentos no laboratório, e por todos os outros tantos momentos de alegrias e risos que compartilhamos durante estes anos. Sua amizade faz falta...

Às amigas de departamento Alexandra Longo, Edaise Silva, Fernanda Ayala, Gilmara Silva, Gwenyth Freeman, Lígia Oliveira, Liliane Afonso, Luciane Kagohara, Luiz Gustavo Covizzi, Maria José Souza, Mérin Bárbara, Renata Ianez e Yukie Sato-Kuwabara, por terem tornado nossa rotina tão agradável;

Às pós-doutorandas Dr^a Cláudia Coutinho, Dr^a Kátia Carvalho e Dr^a Marcilei Buim pela competência e auxílio no dia a dia;

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Fábio Ferreira e Dr. Anuar Mitre por todas as sugestões e comentários que guiaram a confecção deste trabalho;

Às funcionárias da pós-graduação Ana, Luciana, Júlia e Vanuza pela paciência com que sempre me receberam e por estarem sempre dispostas a ajudar;

A toda equipe da biblioteca pela atenção durante as pesquisas bibliográficas e pela formatação deste trabalho.

RESUMO

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

Introdução: Apesar de raro em países desenvolvidos, o carcinoma de pênis constitui um sério problema em regiões menos desenvolvidas. Dentre os principais fatores de risco, estão a falta de higiene, a retenção de esmegma e a presença de fimose. O fator prognóstico mais importante é o envolvimento linfonodal, porém sua avaliação através de métodos clínicos e laboratoriais de imagem é falha. A linfadenectomia, tratamento de escolha para os casos positivos, apresenta alto índice de morbidade. Fatores moleculares capazes de prever o comportamento tumoral ainda não são conhecidos. A família de receptores ErbB, superexpressa em diversos tipos tumorais, participa de processos de proliferação e sobrevivência celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão das proteínas ErbB no carcinoma peniano e sua correlação com variáveis clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes. **Material e Métodos:** Amostras de 188 pacientes portadores de carcinoma peniano foram submetidas à imunoistoquímica para análise da expressão dos quatro membros da família ErbB (EGFR, HER2, HER3 e HER4). Os casos foram avaliados de acordo com intensidade e porcentagem de células marcadas. As análises estatísticas de correlação entre variáveis foram realizadas pelos métodos de chi-quadrado ou teste exato de Fisher. As curvas de sobrevida global e câncer específica foram analisadas pelo estimador produto de limite de Kaplan e Meier, e a comparação entre elas foi feita através do teste de Log-rank. Na análise multivariada para sobrevida, usou-se o modelo de riscos proporcionais de Cox. **Resultados:** Os resultados mostraram que a positividade 3+ de EGFR está associada à variável clínica recidiva na análise univariada ($p=0,031$). Ao ser incluída a categoria 2+ no grupo positivo, este marcador mostrou

associação significativa também com a presença de metástases linfonodais ($p=0,045$), porém apenas um caso sem linfonodos comprometidos foi negativo para o marcador. Esta observação pode ser, por este motivo, apenas um viés estatístico e não uma verdade biológica. Quanto à marcação de HER2, nenhum caso apresentou marcação de membrana. Uma marcação citoplasmática foi, contudo, observada e demonstrou associação significativa com sobrevida global ($p=0,007$). Esta relação manteve significância na análise multivariada, sugerindo que pacientes positivos para a marcação citoplasmática de HER2 tenham risco de óbito aumentado em 2,966 vezes, quando comparado ao risco de pacientes negativos para a marcação ($p<0,001$). Em relação à marcação de HER3 e HER4, foi observada marcação inespecífica e com positividade em 100% dos tumores, o que impossibilitou a realização de testes estatísticos. A busca por fatores de risco independentes para metástases linfonodais identificou as variáveis invasão perineural ($p=0,002$) e estadiamento N ($p=0,014$). Fatores de risco independentes para óbito por câncer foram estadiamento N ($p=0,033$) e recidiva ($p<0,001$). Se se desconsiderar a variável recidiva, permanecem estadiamento N (0,003) e grau histológico ($p=0,016$). Para o risco de óbito por qualquer causa, observa-se recidiva ($p<0,001$), idade ($p<0,001$), estadiamento N (0,003) e, como já dito, marcação citoplasmática de HER2 ($p<0,001$). **Conclusão:** No presente trabalho, foi verificada correlação significativa entre a superexpressão de EGFR e recidiva, indicando um comportamento mais agressivo nesses tumores. Uma relação significativa foi observada também entre a positividade de marcação e a presença de metástases linfonodais, corroborando com a idéia de maior agressividade nestes tumores, porém este dado deve ser interpretado com cuidado, pois pode estar comprometido por artefatos estatísticos. A marcação de membrana de HER2 foi negativa em 100% dos casos; entretanto, sua marcação citoplasmática foi considerada fator de risco para óbito, mostrando um risco aumentado em pacientes positivos. Quanto a HER3 e HER4, foi observada positividade em 100% dos casos e, apesar dos vários testes, não puderam ser avaliados neste estudo.

SUMMARY

Silva AMT. **[Analysis of ErbB family protein expression in penile carcinoma]**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Although rare in developed countries, penile carcinoma is a serious problem for less developed regions. Lack of hygiene, smegma retention and the presence of phimosis are among the main risk factors. The most important prognostic factor is lymph node metastasis. Its evaluation through clinical and laboratorial methods is inaccurate though. lymphadenectomy, which is the treatment of choice for positive cases, presents high level of morbidity. Molecular factors capable of predicting tumor behavior are yet to be described. The ErbB family of receptors is overexpressed in a variety of tumor types and has a role in proliferation and survival mechanisms. Based on that, the goal of the present study was to analyze the expression of ErbB proteins in penile cancer and correlate it with clinical and pathological variables and also with patient survival. **Material and Methods:** Immunohistochemistry was performed in 188 samples of penile cancer in order to analyze the expression pattern of the four members of ErbB family (EGFR, HER2, HER3 and HER4). The cases were scored according to intensity and percentage of stained cells. Statistical analyses among variables were performed using chi-square or Fisher's exact tests. Survival curves were calculated using Kaplan-Meier method and comparisons were made by Log-rank test. Multivariate analysis was performed using Cox regression method. **Results:** The results have shown that EGFR 3+ positivity is associated with the clinical variable recurrence in univariate analysis ($p=0,031$). If one considers the category 2+ as positive, a significant association also with lymph node metastasis ($p=0,045$) is observed, although only one case without compromised lymph nodes was negative for the staining. This observation could be, because of that, simply a

statistical bias and may not correspond to a biological truth. Regarding HER2 staining, none of the cases presented membrane staining. A cytoplasm staining, however, was observed and it demonstrated significant association with overall survival ($p=0,007$). This association was maintained in multivariate analysis, suggesting that patients who are positive for this pattern of staining have the risk of death increased in 2,966 folds when compared to negative patients ($p<0,001$). Regarding HER3 and HER4, an unspecific staining was observed in 100% of tumors, what has impaired the statistical analyses. The multivariate analysis for lymph node metastasis risk factors has identified the variables perineural invasion ($p=0,002$) and N stage ($p=0,014$). Independent risk factors for death related to cancer were N stage ($p=0,033$) and recurrence ($p<0,001$). If recurrence is not considered, it remains N stage (0,003) and histologic grade ($p=0,016$). When death for any reason was considered, significant association was observed with recurrence ($p<0,001$), age ($p<0,001$), N stage (0,003) and, as previously said, cytoplasm HER2 staining ($p<0,001$). **Conclusion:** In the present work, it has been verified a significant correlation between EGFR overexpression and the clinical variable recurrence, indicating a more aggressive behavior in such tumors. A significant association was observed also between positive staining and lymph node metastasis, in accordance with greater aggressiveness in those tumors. However, this data must be interpreted with care once it might be resulted from statistical artifacts. The membrane HER2 staining was negative in 100% of the cases, although its cytoplasm staining was found to be independent risk factor for death, with increased risk for positive patients. Both proteins HER3 and HER4 showed some positivity in 100% of the sample and, besides numerous tests, they could not be evaluated in the present study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo esquemático dos receptores da família ErbB.....	14
Figura 2	Família ErbB em estado inativo na membrana celular e seus ligantes.....	15
Figura 3	Reconhecimento do ligante e exposição do braço de dimerização.....	16
Figura 4	Níveis de expressão de EGFR em carcinoma de pênis.....	38
Figura 5	Fotomicrografias mostrando o padrão de marcação positiva de HER2 em membrana em amostra de carcinoma de pênis..	41
Figura 6	Fotomicrografia da positividade para marcação citoplasmática de HER2 no tecido tumoral e sua ausência no tecido epitelial normal.....	42
Figura 7	Fotomicrografia de caso negativo (A) e um caso positivo (B) para a marcação citoplasmática de HER2 em tumores penianos.....	42
Figura 8	Marcação de HER3 em carcinomas penianos.....	45
Figura 9	Marcação citoplasmática de HER 4 em tumores penianos.....	45
Figura 10	Curva de sobrevida livre de doença para pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.....	50
Figura 11	Curva de sobrevida global para pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.....	54
Figura 12	Curva de sobrevida global para o marcador HER2 citoplasmático.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estimativas para o ano 2010 de número de casos novos de câncer e taxas brutas de incidência por 100.000, em homens, segundo localização primária.....	3
Tabela 2	Representação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos.....	28
Tabela 3	Anticorpos utilizados neste estudo.....	30
Tabela 4	Classificação da expressão imunoistoquímica dos marcadores HER, de acordo com intensidade e padrão de marcação.....	34
Tabela 5	Classificação da expressão imunoistoquímica de EGFR, de acordo com intensidade e padrão de marcação. Agrupamento EGFRII.....	34
Tabela 6	Classificação da expressão imunoistoquímica de EGFR, de acordo com intensidade e padrão de marcação. Agrupamento EGFRIII.....	35
Tabela 7	Expressão de EGFR de acordo com o agrupamento EGFRII e sua associação com variáveis epidemiológicas, clínicas e patológicas.....	40
Tabela 8	Associação da marcação citoplasmática de HER2 e variáveis clínico-patológicas.....	43
Tabela 9	Associação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos com metástase linfonodal.....	46
Tabela 10	Associação da positividade de EGFR com metástase linfonodal.....	48
Tabela 11	Associação da positividade de HER2 com metástase linfonodal.....	48

Tabela 12	Variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	49
Tabela 13	Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal em pacientes portadores de carcinoma de pênis.....	49
Tabela 14	Associação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos com sobrevida câncer específica em 05 anos.....	51
Tabela 15	Variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	53
Tabela 16	Risco de óbito por câncer em pacientes portadores de carcinoma peniano.....	53
Tabela 17	Risco de óbito por câncer em pacientes portadores de carcinoma peniano.....	54
Tabela 18	Associação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos com sobrevida global em 05 e 10 anos.....	55
Tabela 19	Variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	57
Tabela 20	Risco de óbito em pacientes portadores de carcinoma peniano.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	Do inglês, <i>American Joint Comittee on Cancer</i>
ASCO	Do inglês, <i>American Society of Clinical Oncology</i>
CAP	Do inglês, <i>College of American Pathologists</i>
CHO	Do inglês, <i>Chinese Hamster Ovary</i>
DAB	3,3'diaminobenzidina
EGFR	Do inglês, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCT	Fragmentos Carboxi-terminais
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Do inglês, <i>Fluorescence in vitro Hybridization</i>
HER	Do inglês, <i>Human Epidermal growth factor Receptor</i>
HPV	Do inglês, <i>Human Papillomavirus</i>
MAPK	Do inglês, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMP	Do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NRG	Neuregulina
PCNA	Do inglês, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PI3k	Do inglês, <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TMA	Do inglês, <i>Tissue Microarray</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma de Pênis	2
1.1.1	Epidemiologia	2
1.1.2	Fatores de Risco	4
1.1.3	Patogênese	6
1.1.4	Aspectos Patológicos	8
1.1.5	Aspectos Moleculares	11
1.2	Fatores de Crescimento e seus Receptores.....	12
1.2.1	Família ErbB.....	13
1.2.2	Receptores ErbB e Câncer.....	17
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	Seleção dos Pacientes	26
3.1.1	Caracterização da Amostra	26
3.2	Anticorpos Primários	30
3.3	Construção dos <i>Tissue Microarrays</i>	30
3.4	Ensaio Imunoistoquímico em Cortes Convencionais	31
3.5	Ensaio Imunoistoquímico nos <i>Tissue Microarrays</i>	32
3.6	Interpretação das Análises Imunoistoquímicas	33
3.7	Análise Estatística	35
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Imunoistoquímica de EGFR.....	38
4.2	Imunoistoquímica de HER2	41
4.3	Imunoistoquímica de HER3	44
4.4	Imunoistoquímica de HER4	45
4.5	Avaliação do Envolvimento Linfonodal	46

4.5.1	EGFR e Envolvimento Linfonoda	47
4.5.2	HER2 e Envolvimento Linfonodal	48
4.5.3	Análise Multivariada	48
4.6	Avaliação da Sobrevida	50
4.6.1	Sobrevida Câncer específica	50
4.6.2	Sobrevida Global	54
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE PÊNIS

1.1.1 Epidemiologia

O carcinoma peniano é uma doença rara em nações desenvolvidas, representando menos de 1% de todas as neoplasias malignas na Europa e América do Norte. Em contrapartida, é um importante problema para países em desenvolvimento (MISRA et al. 2004; SALVIONI et al. 2009), onde a incidência chega a 4,4 casos/100.000 habitantes no Paraguai e Ruanda, por exemplo. Nesses lugares, pode representar até 20% de todas as neoplasias (SALVIONI et al. 2009).

Em estudo epidemiológico promovido pela Sociedade Brasileira de Urologia entre maio de 2006 e junho de 2007, demonstrou-se que, no Brasil, um dos líderes mundiais em incidência, há regiões que registram 2,9 a 6,8 casos/100.000 habitantes, o que representa até 5,7% de todas as neoplasias.. Em regiões de maior incidência, o câncer de pênis supera os casos de câncer de próstata e de bexiga, e isto confere grande importância para o seu estudo. O trabalho demonstrou ainda que as maiores taxas de incidência são registradas nas regiões norte e nordeste do Brasil (53,02% de todos os casos no país). Os casos na região sul representaram menos de 1%. Apenas no estado do Maranhão, um estado pouco populoso e com

baixo índice de desenvolvimento humano, concentraram-se 22,7% dos casos (FAVORITO et al. 2008).

Somente através do Sistema Único de Saúde (SUS), são realizadas, anualmente, no Brasil, mil penectomias, sendo o carcinoma peniano a principal indicação para o procedimento. Entretanto, de acordo com as estimativas do Ministério da Saúde de novos casos para 2010, o câncer de pênis não está entre os mais frequentes, conforme mostra a Tabela 1 (Ministério da Saúde 2009).

Tabela 1 - Estimativas para o ano 2010 de número de casos novos de câncer e taxas brutas de incidência por 100.000, em homens, segundo localização primária.

Localização Primária	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	52.350	53,84	14.050	66,25
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	18,37	4.980	23,53
Estômago	13.820	14,25	3.490	16,48
Cólon e Reto	13.310	13,73	4.570	21,62
Cavidade Oral	10.330	10,64	2.920	13,74
Esôfago	7.890	8,12	1.610	7,37
Leucemias	5.240	5,40	1.440	7,06
Pele Melanoma	2.960	3,04	850	6,84
Outras localizações	59.130	61,01	18.590	87,67
SUBTOTAL	182.830	188,66	52.500	247,59
Pele não Melanoma	53.410	55,12	11.880	55,97
TODAS AS NEOPLASIAS	236.240	243,77	64.380	303,50

Fonte: Ministério da Saúde (2009)

No Brasil, a doença acomete preferencialmente indivíduos brancos e a incidência parece ser aumentada a partir da 4ª década de vida (FAVORITO et al. 2008). O perfil mundial, com significativa menor incidência, apresenta-se com idade média discretamente maior, entre 60 e

70 anos, sendo infrequente em adultos abaixo de 30 anos e raro em crianças (FICARRA et al. 2006; BLEEKER et al. 2009; SALVIONI et al. 2009).

A maior incidência da doença em indivíduos negros comparados a caucasianos já foi reportada (BUSBY e PETTAWAY 2005) sem ser discutida, porém, a influência de outras variáveis associadas, como fator socioeconômico e maior dificuldade de acesso à saúde. No Brasil, raça não parece ser um fator de risco determinante para ocorrência deste tipo de neoplasia, apesar de ser a maioria dos pacientes pertencentes à raça branca (FAVORITO et al. 2008). O diagnóstico é, em geral, tardio e o óbito em decorrência da doença ocorre em 70% dos casos depois de dois a três anos do diagnóstico inicial (FICARRA et al. 2002).

O impacto psicológico da doença e do tratamento na vida do paciente é um fator importante. Em revisão sistemática de trabalhos da literatura entre os anos de 1985 e 2008 mostrou-se que, dentre os efeitos negativos mais comuns, estão a baixa qualidade de vida ou bem-estar e função sexual comprometida. Aproximadamente 50% dos pacientes apresentaram distúrbios psiquiátricos (MADDINENI et al. 2009).

1.1.2 Fatores de Risco

Os principais fatores de risco citados na literatura são a falta de higiene, a retenção de produtos urinários e células epidérmicas que descamam normalmente (esmegma), a presença de fimose, número de parceiros sexuais, histórico de doenças venéreas (em especial, a infecção

por HPV) e o uso de tabaco. Outras condições estão associadas a estes tumores, como inflamação, feridas ou ulcerações no pênis (DALING et al. 2005; BLEEKER et al. 2009).

A frequência de fimose é alta em homens com carcinoma de pênis, chegando a 85% em alguns estudos (DILLNER et al. 2000). Por causar a retenção de esmegma, a fimose gera condições de irritação crônica com ou sem inflamação bacteriana do prepúcio e da glândula, que podem representar um componente crítico no desenvolvimento e progressão do tumor (BLEEKER et al. 2009). Homens não submetidos à postectomia durante a infância, especialmente no período neonatal, têm risco aumentado de desenvolver tanto a doença *in situ* quanto invasiva. A maior proteção está relacionada aos tumores invasivos (SCHOEN et al. 2000; DALING et al. 2005). Populações que realizam, por motivos religiosos e culturais, a postectomia em recém-nascidos, como judeus, são menos suscetíveis e a incidência de tumores penianos nestas populações é próxima a zero (VATANASAPT et al. 1995).

Vários estudos demonstram o envolvimento de HPVs oncogênicos (ou de alto risco), especialmente HPV 16 e 18, na patogênese de tumores. A positividade para HPV é detectada por PCR em cerca de 30% a 61% dos casos (MADEN et al. 1993; BEZERRA et al. 2001; RUBIN et al. 2001). Em condilomas, a positividade chega a 100%. A associação de infecção com esta neoplasia tem sido comprovada por diversos estudos epidemiológicos, porém a soropositividade para o HPV 16 não parece estar tão associada ao carcinoma peniano quanto está ao cervical. A porcentagem de HPV positivos

parece ser mais semelhante ao carcinoma de vulva (RUBIN et al. 2001). Carcinomas positivos para HPV parecem apresentar menos embolização linfática (BEZERRA et al. 2001). Mais recentemente, LONT et al (2006) demonstraram que pacientes positivos para HPVs de alto risco parecem ter maior sobrevida. Na análise multivariada, a relação se manteve, com um risco relativo de óbito por câncer discretamente superior ($RR = 0,21$) para pacientes não portadores destas variantes virais. (LONT et al. 2006).

Entretanto, BEZERRA et al. (2001) demonstraram que o status do HPV não influencia o prognóstico em casos de carcinoma peniano invasivo.

Contraditoriamente, a positividade de HPV, quando associada a um aumento da expressão da proteína p53, demonstrou associação com pior prognóstico para pacientes (LOPES et al. 2002).

Quanto ao uso de tabaco, MADEN et al. (1993) demonstraram risco elevado em fumantes, com um aumento no risco de acordo com a quantidade de cigarros consumidos por ano. Posteriormente, foi relatado um risco 4,5 vezes maior para fumantes desenvolverem carcinoma invasivo quando comparado com homens que nunca fumaram (DALING et al. 2005). O papel exato do cigarro na carcinogênese ainda é, entretanto, desconhecido.

1.1.3 Patogênese

O carcinoma peniano pode apresentar-se como um tumor exofítico, mas, na grande maioria dos casos, apresenta um padrão de crescimento infiltrativo. A associação entre padrão de invasão e embolização linfática já

foi demonstrada, sendo este padrão considerado fator independente na predição de metástases linfonodais (GUIMARÃES et al. 2006).

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. Quando não tratado em estágios iniciais, estende-se para o prepúcio, evolui infiltrando tecidos adjacentes como o tecido subepitelial conjuntivo, corpo esponjoso e corpo cavernoso até invadir órgãos adjacentes como próstata e bexiga. Metástases à distância são pouco comuns (CUBILLA 2008).

Esta neoplasia dissemina-se por via linfática, apresentando metástases regionais, preferencialmente para os linfonodos inguinais e, depois, para os ilíacos (NARAYAMA et al. 1982; PERSKY e DEKERNION 1986). Metástases linfonodais para esta região são, portanto, a via de disseminação precoce no carcinoma peniano e constituem o principal fator prognóstico da doença (LOPES et al. 1996). As metástases por via hematogênica são incomuns ocorrendo entre 1 a 10%. Em casos avançados, complicações locorregionais, com tumor infiltrando feixe vasculo-nervoso levando à hemorragia e septicemia, são as principais causas de morte (PURAS et al. 1978).

A avaliação clínica dos linfonodos comprometidos é complexa, pois em cerca de metade dos casos, o aumento do linfonodo ocorre por reações inflamatórias do próprio tumor, e não pela presença de metástases. Entretanto, cerca de 20% dos pacientes clinicamente negativos na avaliação linfonodal apresentam micrometástases ocultas (HORENBLAS 2001;

FICARRA et al. 2009). Os métodos convencionais de imagem (ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) apresentam baixa sensibilidade e especificidade na detecção destas metástases; assim como os dois *guidelines* existentes para selecionar grupos de risco (SOLSONA et al. 2004; FICARRA et al. 2009).

Em caso de envolvimento linfonodal, a linfadenectomia é o procedimento indicado, pois aumenta a sobrevida em pacientes sabidamente positivos. Porém a alta taxa de complicações é alta, e vão desde a infecção da ferida (em 24 – 87% dos casos) até necrose (8 – 54%), linfedema (27-100%) e até óbito (3%). Estas comorbidades associadas reforçam a necessidade de cuidado no estabelecimento de critérios para seleção de pacientes a serem submetidos ao procedimento (FICARRA et al. 2002). Isto explica o empenho de grandes grupos na descoberta de marcadores que possam predizer o risco de metástases linfonodais.

Aspectos moleculares, a serem abordados em seguida, ainda são pouco conhecidos, sendo a maioria dos estudos baseada em expressão proteica através da técnica de imunoistoquímica.

1.1.4 Aspectos Patológicos

A grande maioria das neoplasias malignas do pênis é constituída por carcinomas, que representam 95% dos casos. Dados anatomopatológicos do tumor, como o grau de diferenciação e o padrão de invasão, têm importância em relação à definição da probabilidade de envolvimento

linfonodal (FRALEY et al. 1989; HORENBLAS et al. 1993; GUIMARÃES et al. 2006).

Cerca de 50% dos casos de carcinoma epidermóide, ou de células escamosas, são do tipo usual. Os demais tipos histológicos são o carcinoma verrucoso, basocelular, melanoma, sarcoma, e o mais recentemente descrito, acantolítico. Estes são mais raros e maiores em tamanho, mais infiltrativos e de alto grau histológico, com maior incidência de metástases linfonodais e maior mortalidade (CUNHA et al. 2009).

O subtipo histológico tem papel importante no prognóstico do paciente, já tendo sido associado ao risco de metástases linfonodais e de óbito. Os subtipos papilar e Warty são de baixo risco tanto para metástases quanto para óbito, enquanto sarcomatóides apresentam alto risco para ambos. Tumores mistos apresentam risco intermediário (GUIMARÃES et al. 2009).

A embolização vascular – linfática e venosa – foi a primeira variável patológica descrita como fator prognóstico independente para o câncer peniano por sua associação à metástase linfonodal (LOPES et al. 1996), posteriormente confirmado em outros trabalhos (SLATON et al. 2001; FICARRA et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2006). A espessura do tumor também foi associada a este evento (LOPES et al. 1996), assim como estadiamento clínico N (CAMPOS et al. 2006). A classificação TNM, atualmente utilizada de acordo com o *American Joint Comitee on Cancer* (AJCC), está descrita no Anexo 1 e se baseia na avaliação da extensão

tumoral (T), extensão do comprometimento linfonodal (N) e presença de metástases (M).

O grau de diferenciação é um aspecto descrito por muitos autores como preditivo de comprometimento linfonodal e sobrevida global. Tumores pouco diferenciados apresentam risco maior de desenvolvimento de metástases (SLATON et al. 2001; FICARRA et al. 2002; CUNHA et al. 2009).

O padrão de crescimento e invasão tumoral (exofítico ou infiltrativo) foi correlacionado ao comprometimento linfonodal, sendo observada maior incidência de metástases linfonodais no padrão infiltrativo (65%) quando comparado ao padrão exofítico (23%) (GUIMARÃES et al. 2006).

Todavia, o comprometimento linfonodal ainda constitui o principal fator prognóstico. Devido à dificuldade de avaliação desta condição, nomogramas vêm sendo criados a fim de estimar este risco e de selecionar com maior critério os pacientes que realmente se beneficiariam da linfadenectomia radical considerando prognóstico e sobrevida, apesar da morbi-mortalidade inerente ao procedimento. Estes nomogramas baseiam-se no estadiamento clínico dos linfonodos inguinais e nos achados patológicos dos tumores primários (FICARRA et al. 2006; VELAZQUEZ et al. 2008). O mais recente deles aponta que grau histológico e invasão perineural são mais importantes na predição de metástases linfonodais que a espessura do tumor, localização anatômica e invasão vascular (VELAZQUEZ et al. 2008).

Contudo, não há ainda precisão incontestável no estadiamento tumoral. Fatores biomoleculares preditivos de prognóstico vêm sendo

amplamente estudados, buscando, assim, ampliar as ferramentas disponíveis para o melhor estadiamento e seleção de pacientes.

1.1.5 Aspectos Moleculares

O primeiro estudo a nível molecular em carcinoma peniano avaliou sua relação com o supressor tumoral p53, alterado em um grande número de neoplasias. O estudo demonstrou que p53 é fator independente de risco para metástase no linfonodo e morte, sendo o risco maior para pacientes p53 positivos. No mesmo estudo, avaliou-se a associação entre a positividade para p53 na presença de DNA de HPV com pior prognóstico (LOPES et al. 2002). Outros estudos demonstraram também que a superexpressão de p53 está associada à disseminação linfática, recorrência e sobrevida câncer específica (MARTINS et al. 2002; ZHU et al. 2007).

E-caderina, molécula de adesão geralmente hipoexpressa em tecidos tumorais foi avaliada e a diminuição de sua expressão foi associada com maior risco de metástases linfonodais (CAMPOS et al. 2006).

A expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), família de enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da matriz celular que facilita os processos de migração e motilidade celular, foi estudada e confrontada com padrões de crescimento e invasão do carcinoma peniano. Uma associação interessante foi observada entre a expressão aumentada das MMP2 e MMP9 e tumores com pouca diferenciação histológica, que são mais invasivos e com padrão de invasão em pequenos grupos celulares

(SOARES et al. 2006). MMP9 foi ainda demonstrada como fator independente de risco para recorrência (CAMPOS et al. 2006).

GUIMARÃES et al. (2007) mostraram uma correlação entre a expressão de PCNA e MIB-1/KI-67 e metástases linfonodais, porém não houve correlação entre os marcadores e sobrevida.

Nenhum destes estudos é, porém, conclusivo. Em recente revisão da literatura, entretanto, observou-se que o papel dos marcadores moleculares precisa ser mais explorado no carcinoma de pênis, a fim de que a biologia deste tipo tumoral, assim como sua evolução, seja mais bem compreendida (MUNEER et al. 2009).

1.2 FATORES DE CRESCIMENTO E SEUS RECEPTORES

Fatores de crescimento são moléculas proteicas que atuam basicamente na regulação do ciclo celular. Desempenham papel importante nos processos de proliferação, adesão, migração, diferenciação e sobrevivência celular. São, em geral, proteínas solúveis e de baixo peso molecular que podem ser secretadas tanto por células estromais (secreção parácrina) quanto pela própria célula sobre a qual atuarão (ação autócrina) (SNITCOVSKY e BRENTANI 2003). Esta última característica é de particular importância para tumores por reduzir a necessidade de suprimentos exógenos para manter altas taxas de proliferação (NORMANNO et al. 2006).

Para exercer seu papel biológico, estas moléculas ligam-se a proteínas inseridas na membrana plasmática (chamadas receptores) e causam nelas

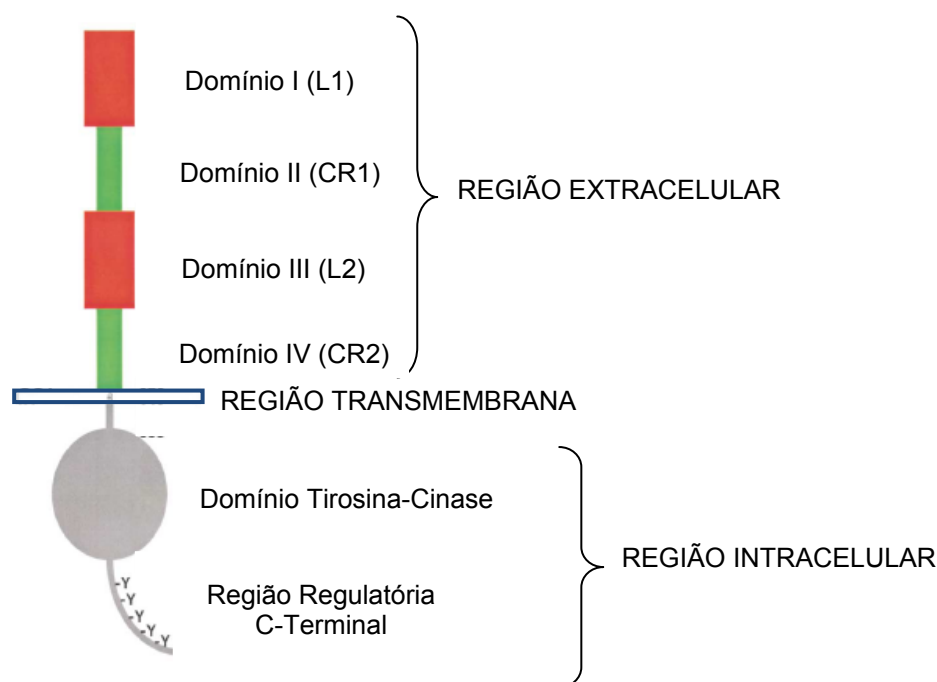
uma modificação estrutural. Através desta modificação, o sinal do meio externo pode ser percebido no meio intracelular e gerar eventos como a divisão, crescimento celular ou ativação da transcrição de genes-alvo (SNITCOVSKY e BRENTANI 2003).

Os receptores possuem três regiões: uma região extracelular, que é responsável pelo reconhecimento do ligante; uma região hidrofóbica, que ancora a proteína à membrana; e uma região citoplasmática, responsável por iniciar dentro da célula a cascata de sinalização até o alvo específico. O grupo de receptores que possui atividade tirosina-cinase em sua porção citoplasmática é o mais importante entre os receptores de membrana. Por causa desta atividade enzimática, os receptores são capazes de fosforilar outras cinases, transmitir e amplificar o sinal recebido (BERG et al. 2008).

1.2.1 Família ErbB

As proteínas da família ErbB são um grupo de receptores de fatores de crescimento epidérmico do tipo tirosina-cinase composto por quatro moléculas homólogas: EGFR (do inglês, *epidermal growth factor receptor*; também chamado de c-erbB-1 ou HER1), HER2 (ou c-erbB-2), HER3 (ou c-erbB-3) e HER4 (ou c-erbB-4) (OLAYIOYE et al. 2000). Possuem expressão aumentada em cerca de um terço dos tumores epiteliais (MENDELSON 2001) e desempenham papel central na proliferação de células tumorais, em processos de angiogênese e metástase, sendo, por esta razão, intensamente explorados como alvos terapêuticos (YARDEN 2001; HARARI et al. 2004; HYNES e LANE 2005).

Os membros desta família são compostos por três regiões. Uma região extracelular, que se liga ao sinal; uma região hidrofóbica transmembrana, que ancora a proteína na membrana plasmática e uma região intracelular com atividade tirosina-cinase seguida de região regulatória C-terminal, conforme Figura 1 (BURGESS et al. 2003).

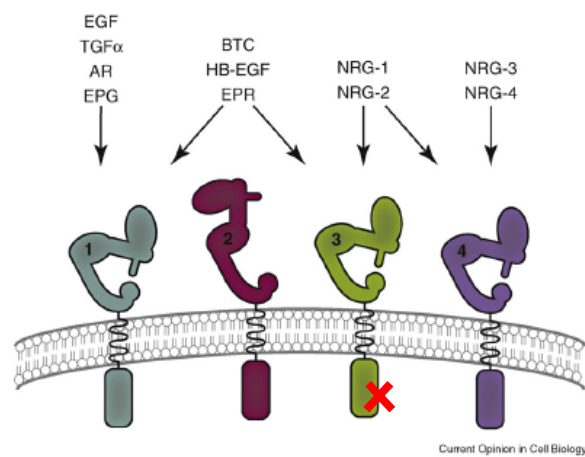


Fonte: BURGESS et al. (2003).

Figura 1 - Modelo esquemático dos receptores da família ErbB.

A região extracelular consiste em cerca de 620 resíduos de aminoácidos e é altamente glicosilada. Esta porção é bastante diversificada entre os membros da família, o que permite o reconhecimento de uma ampla gama de ligantes. Contém quatro domínios distintos, dois domínios homólogos (L) e dois ricos em cisteínas (CR). O domínio II forma um *loop* denominado braço de dimerização e é a estrutura que possibilita a formação de dímeros entre os receptores (BURGESS et al. 2003).

A região intracelular parece ser bastante conservada entre os membros, com exceção de HER3 que, por uma modificação em aminoácido no sítio catalítico, não apresenta atividade tirosina-cinase, mas pode ser ativado por outros membros da família (HSIEH e MOASSER 2007). Cada membro se liga a um grupo específico de moléculas, o que influenciará diretamente na cascata intracelular a ser ativada (HYNES e MACDONALD 2009). A conformação de cada um dos receptores e seus ligantes solúveis está apresentada na Figura 2.

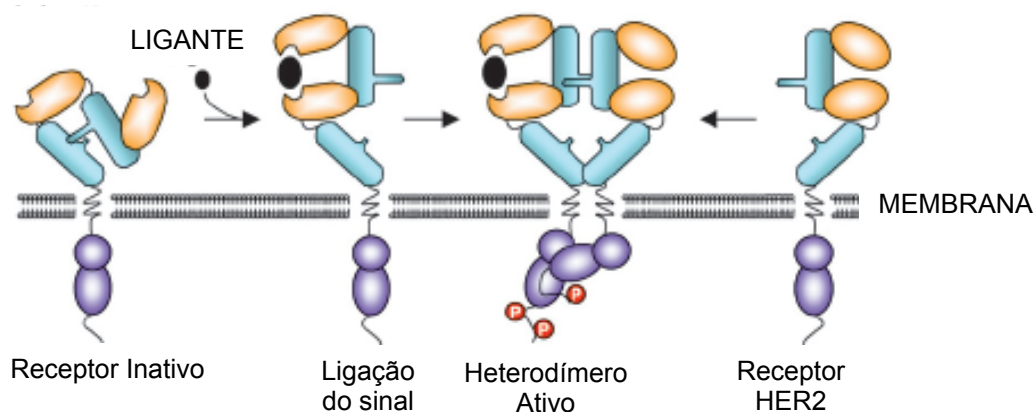


Fonte: HYNES e MACDONALD (2009).

Figura 2 - Família ErbB em estado inativo na membrana celular e seus ligantes.

Em seu estado inativo, os receptores não possuem o braço de dimerização exposto, à exceção de HER2. É o reconhecimento do ligante que gera a modificação conformacional responsável por expor este braço e permitir a ligação entre dois receptores formando homo ou heterodímeros (Figura 3) (TAO e MARUYAMA 2008). Em dímeros, eles são capazes de realizar fosforilação cruzada das porções intracelulares e iniciar as cascatas

de sinalização relacionadas tanto com a proliferação e diferenciação quanto com a sobrevivência celular (BASELGA e SWAIN 2009).



Fonte: WIEDUWILT e MOASSER (2008).

Figura 3 - Reconhecimento do ligante e exposição do braço de dimerização.

Apesar de HER2 e HER3 não apresentarem autonomia no desencadeamento do sinal (pois ambos são defectivos e não formam, por esta razão, homodímeros), ambos são capazes de formar complexos heterodiméricos e com outros membros da família e gerar potentes sinais celulares (CITRI e YARDEN 2006).

Dentre as principais vias ativadas por estes receptores, estão as vias Ras/Raf/MAPK, ativada por todos os membros da família; e PI3K, cujo potencial de indução dependerá do receptor. Ambas são importantes em processos de tumorigênese por aumentar a proliferação, a motilidade e a sobrevivência celular, auxiliando no escape a apoptose (NORMANNO et al. 2006).

Estudos têm sugerido que a ativação aberrante desses receptores do tipo cinase desempenha importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral sendo, por esta razão, alvo no desenvolvimento de novas terapias (YARDEN 2001; ROWINSKY 2003).

1.2.2 Receptores ErbB e Câncer

EGFR ou HER1, o membro protótipo da família, é uma proteína de 170 kDa codificada pelo gene localizado no cromossomo 7p12. Este receptor está superexpresso em 30% a 50% dos casos de carcinomas (MENDELSON 2001; GRUNWALD e HIDALGO 2003). A variação deve-se possivelmente à falta de padronização de interpretação das reações. Contudo, a expressão de EGFR é um evento constante em tumores epiteliais (HARARI et al. 2004).

Há relatos de superexpressão de EGFR em tumores de cabeça e pescoço (72-100%), canal anal (100%), esôfago (43-89%), pâncreas (30-89%), pulmão (40-80%) e mama (14-90%), entre outros (FORD e GRANDIS 2003; HARARI et al. 2004; LÊ et al. 2005; SATO-KUWABARA et al. 2009; RYOTT et al. 2009).

Em revisão de 200 estudos publicados na literatura, NICHOLSON et al. (2001) demonstraram o valor prognóstico deste marcador para diversos tumores. Nos tumores de cabeça e pescoço, esôfago, colo de útero e bexiga, a expressão de EGFR foi associada com menor sobrevida global e livre de doença em 70% dos trabalhos. Em tumores gástricos, mamários, endometriais e colorretais, EGFR apresentou valor prognóstico moderado

relacionando-se com menor sobrevida em 52% dos estudos. Em tumores de pulmão, apenas um terço dos estudos demonstrou associação com menor sobrevida (NICHOLSON et al. 2001). Em carcinoma de cólon, não parece haver associação entre expressão e prognóstico (BAIOCCHI et al. 2009).

Tumores penianos apresentam alta taxa de superexpressão do marcador através da técnica de imunoistoquímica na grande maioria dos casos (90%). Apesar disso, nenhuma associação com variáveis clínico-patológicas ou sobrevida foi observada (BÖRGERMANN et al. 2009).

O receptor HER2 é codificado pelo gene localizado no cromossomo 17. Sua conformação difere da dos demais membros da família por apresentar, em estado inativo, o braço de dimerização constantemente exposto e o sítio de reconhecimento do ligante inacessível (Figura 3). Esta conformação explica o fato de não possuir ligantes solúveis conhecidos (HOLBRO et al. 2003; ROSKOSKI, 2004).

Em adenocarcinomas de mama, HER2 é superexpresso em cerca de 25% dos casos e é um marcador prognóstico bem estabelecido, que indica doença mais agressiva com necessidade de terapia adjuvante. Nestes tumores, HER2 parece ser o preferencial na formação de heterodímeros (HUDELIST et al. 2003). Pacientes com superexpressão devido à amplificação gênica são indicados à terapia-alvo baseada em anticorpo ou em inibidores tirosina-cinase (AZIZ et al. 2001).

Para tumores de cólon e cabeça e pescoço, HER2 parece não ter valor prognóstico ou preditivo de metástases linfonodais (KAZKAYASI et al. 2001; ANGIERO et al. 2008; BAIOCCHI et al. 2009).

Recentemente, nosso grupo demonstrou em carcinoma de células escamosas de esôfago que a superexpressão de HER2 por imunohistoquímica não parece relacionar-se com sobrevida, porém ao se observar a amplificação gênica pelo método de FISH, foi observada uma diminuição significativa na sobrevida dos indivíduos com amplificação (SATO-KUWABARA et al. 2009).

O gene que codifica a proteína HER3 está localizado no cromossomo 12q13. Este receptor é o único da família que não possui atividade tirosina-cinase em sua porção citoplasmática devido a uma modificação de aminoácidos em seu sítio catalítico. Ainda assim, é o preferencial na formação de heterodímeros, ativando especialmente a via PI3K-Akt (BASELGA e SWAIN 2009).

HER3 é comumente superexpresso em tumores de mama que superexpressam HER2 e, apesar da deficiência de cada um individualmente, este dímero é capaz de induzir o mais potente sinal de ativação da via MAPK (CITRI et al. 2003). Em tumores colorretais, a negatividade para este marcador foi mostrada como fator de risco independente para recorrência (BAIOCCHI et al. 2009).

Em contrapartida, LEE et al (2001) demonstraram que uma isoforma solúvel de HER3 é capaz de inibir a ativação dos demais membros da família ErbB, associando-se, assim, a um prognóstico positivo.

Novos anticorpos com alvo em HER3 estão sendo estudados e dados sugerem que a inibição de seu domínio tirosina-cinase possa inibir sua ativação ou sua participação na via PI3k (BASELGA e SWAIN 2009).

HER4 é codificado pelo gene localizado no cromossomo 2q33. Seu papel na carcinogênese é menos explorado do que o dos demais receptores. Há indícios, inclusive, de seu envolvimento com a inibição do ciclo celular, ao contrário do restante da família (BASELGA e SWAIN 2009).

Em carcinoma de cólon, os dados são contraditórios. KOUNTOURAKIS et al. (2006) demonstraram a superexpressão do marcador relacionada à doença mais agressiva e com maior potencial metastático, enquanto BAIOCCHI et al. (2009) não observaram associação com o prognóstico.

Em tumores de mama, sua marcação em citoplasma e núcleo celular já foi associada a um pior prognóstico (LODGE et al. 2003).

Alguns trabalhos vêm reportando a presença dos receptores da família ErbB fora da membrana plasmática, seja em sua forma completa ou fragmentada (LIN et al. 2001; OFFTERDINGER et al. 2002; WELLS e MARTI 2002; CARPENTER 2003). Dados sugerem que essas moléculas podem ser translocadas ao núcleo e atuar como fatores de transcrição ao ligar sua extremidade citoplasmática diretamente ao DNA ou fosforilar proteínas nucleares, ou funcionar ainda como modulares da transcrição e tradução, alterando a torção da cromatina ou participando do processamento de mRNAs (WELLS e MARTI 2002).

O papel da ativação desses receptores, principalmente HER1 e HER2, vem sendo amplamente estudado em diversas neoplasias malignas, com ênfase em carcinoma de mama, originando, inclusive, terapêuticas específicas (ROSKOSKI 2004, HYNES e LANE 2005). Há duas abordagens

principais de terapias. Uma é a terapia baseada em anticorpos, que consiste no uso de anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos da região extracelular do receptor. O complexo formado é internalizado e degradado, inibindo a via e ainda possibilitando a geração de resposta imunológica. A outra abordagem é baseada em pequenas moléculas inibidoras, que se ligam à porção intracelular do receptor e bloqueiam sua atividade tirona-quinase (HARARI et al. 2004).

A superexpressão das proteínas de modo geral tem sido associada a pior prognóstico em diversas neoplasias, porém seu comportamento, no carcinoma peniano, ainda não está esclarecido. Apenas dois estudos recentes na literatura avaliaram a expressão de EGFR em carcinoma de pênis, porém nenhuma relação com comprometimento linfonodal ou sobrevida foi encontrada (BÖRGERMANN et al. 2009; LAVENS ET AL. 2010).

Por ser o carcinoma peniano uma neoplasia típica de países em desenvolvimento, poucos estudos dedicam-se a elucidar suas causas e seu comportamento molecular. Para países desenvolvidos, por causa da baixa incidência, a casuística torna-se um problema importante e, por isto, é extremamente necessário que países onde a incidência é elevada, como o Brasil, se empenhem na busca por novos marcadores moleculares para elucidar as causas e, principalmente, explorar novas possibilidades terapêuticas para estes pacientes, já tão abalados pelo forte fator psicológico associado tanto à doença em si quanto às abordagens terapêuticas usadas atualmente.

Portanto, frente ao sério problema que esta neoplasia representa para países em desenvolvimento e a escassez de informações verdadeiramente relevantes sobre a biologia tumoral e o prognóstico, estudo que busquem ampliar as fronteiras do conhecimento sobre o tema são claramente necessários.

Objetiva

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar os níveis de expressão das proteínas da família ErbB (HER1, HER2, HER3 e HER4) em tecidos de carcinoma peniano através de imunoistoquímica e correlacioná-los com os dados clínicos e patológicos, presença de metástase linfonodal e sobrevida.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Amostras retrospectivas de 188 pacientes do Centro de Tratamento Pesquisa Hospital do Câncer AC Camargo foram selecionadas para o presente estudo após a avaliação de prontuários e revisão dos achados anatomopatológicos. Foram selecionados casos que dispunham de quantidade suficiente de material tumoral conservado em parafina para os ensaios imunoistoquímicos nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da instituição.

Para os marcadores HER1 e HER2, foram utilizados 188 casos em cortes histológicos convencionais. Para HER3 e HER4, foram utilizadas lâminas de TMA (do inglês, *Tissue Microarrays*) contendo 345 amostras retrospectivas de pacientes do mesmo centro, selecionadas após avaliação de prontuários e revisão de achados anatomopatológicos.

3.1.1 Caracterização da Amostra

A amostra é composta por homens com idade média de 55,28 anos e mediana de 55 anos. Os dados epidemiológicos, clínicos e patológicos estão sumarizados na Tabela 2.

Nesta casuística, a maioria dos pacientes (61,4%) tinha idade menor ou igual a 60 anos, era da raça branca (75,5%) e não relatou presença de

antecedentes venéreos (64,9%). Observou-se predominância do estadiotumoral T2 (51,6%), seguido de tumores T3 (34%) e T1 (10%). Tumores em estadiotumoral T4 representaram apenas 4,3% da amostra. Tumores em estadiotumoral N0 representaram 55,9%, enquanto N1 e N2 foram encontrados basicamente na mesma proporção (20,2% e 22,9%, respectivamente). Quanto ao grau histológico, 46 casos (24%) foram classificados como baixo grau, 69 casos (36,9%) de grau intermediário e 72 casos (38,5%) de alto grau.

A invasão sanguínea vascular e linfática foi detectada em 141 casos (77%). Ocorreu invasão perineural em 134 casos (73,2%), invasão do corpo esponjoso 147 (90,2%) e invasão do corpo cavernoso em 105 (66%). A uretra foi invadida em 54 (31,6%) casos. Quanto às bordas, elas foram regulares em 46 casos (25,7%) e irregulares na maioria, 133 casos (74,3%).

A postectomia foi realizada em 31 pacientes (16,5%) e, em 12,2% dos casos, o procedimento foi relacionado à doença. Como forma de tratamento, 123 pacientes (66,9%) foram submetidos à amputação parcial do pênis, 57 (31,0%) à amputação total, 3 (1,6%) à amputação períneo-abdominal e 1 paciente (0,5%) foi submetido à postectomia. A linfadenectomia foi realizada em 37,7% da amostra, sendo que 23 pacientes (12,2%) foram submetidos ao esvaziamento inguinal, enquanto 48 (25,5%) foram submetidos ao inguinal e ilíaco. O procedimento não foi realizado em 117 pacientes (62,2%). Dos 71 pacientes que foram submetidos a este procedimento, 45 (66,4%) tiveram a confirmação patológica da positividade linfonodal.

Na primeira consulta, 119 pacientes (64,0%) tinham o órgão intacto, enquanto 62 (33,3%) haviam realizado biópsia e 5 (2,7%) haviam sido previamente amputados em outro serviço.

Tabela 2 - Representação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos.

Características	N	%
Idade		
Menor ou igual a 60 anos	115	61,2
Maior de 60 anos	73	38,8
Raça		
Branca	142	75,5
Não branca	46	24,5
Antecedentes Venéreos		
Ausente	74	64,9
Presente	40	35,1
Não Avaliáveis	74	
Infecção por HPV		
Não	13	21,3
Sim	48	78,7
Não Avaliáveis	127	
Estadio T		
T1	19	10
T2	97	51,6
T3	64	34,0
T4	8	4,3
Estadio N		
N0	105	55,9
N1	38	20,2
N2	43	22,9
Não Avaliáveis	2	
Grau Histológico		
Baixo grau	46	24,6
Intermediário	69	36,9
Alto grau	72	38,5
Não Avaliáveis	1	
Invasão Vascular Sanguínea e Linfática		
Não	42	23,0
Sim	141	77,0
Não Avaliáveis	5	

Cont/ Tabela 2

Características	N	%
Invasão Perineural		
Não	49	26,8
Sim	134	73,2
Não Avaliáveis	5	
Invasão do Corpo Esponjoso		
Não	16	9,8
Sim	147	90,2
Não Avaliáveis	25	
Invasão do Corpo Cavernoso		
Não	54	34,0
Sim	105	66,0
Não Avaliáveis	29	
Infiltração da Uretra		
Não	86	68,4
Sim	54	31,6
Não Avaliáveis	48	
Bordas		
Regular	46	25,7
Irregular	133	74,3
Não Avaliáveis	9	
Postectomia		
Não realizada	157	83,5
Não relacionada ao câncer	8	4,2
Relacionada ao câncer	23	12,2
Tipo de Cirurgia para Tratamento		
Amputação Parcial	123	66,9
Amputação Total	57	31,0
Amputação períneo-abdominal	3	0,5
Postectomia	1	1,6
Esvaziamento Ganglionar		
Inguinal	23	12,2
Inguinal ilíaco	48	25,5
Não realizado	117	62,2
Total de Linfonodos Patológicos Positivos		
Não	26	36,6
Sim	45	63,4
Não Avaliados	117	
Situação na primeira consulta		
Biópsia	62	33,3
Amputação	5	2,7
Intacto	119	64,0

3.2 ANTICORPOS PRIMÁRIOS

As reações de imunoistoquímica em cortes parafinados foram realizadas pela técnica de polímero sem biotina (Advanced, Dako) para os marcadores EGFR, HER2, HER3 e HER4. Os dados nos ensaios estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Anticorpos utilizados neste estudo.

Antígeno	Diluição	Clones	Marca
EGFR	1:200	EGFR25	Leica™
HER2	1:500	CB11	Leica™
HER3	1:300	Policlonal	Neomarker
HER4	1:100	Policlonal	Neomarker

3.3 CONSTRUÇÃO DOS *TISSUE MICROARRAYS*

A metodologia de construção do bloco de *Tissue Microarray* (TMA) está detalhadamente descrita por ANDRADE et al. (2007).

De posse dos casos, foram montados blocos utilizando-se o dispositivo técnico *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA). A metodologia para construção dos blocos tem sido amplamente utilizada nos últimos quatro anos no Hospital do Câncer AC Camargo.

As áreas do tumor foram selecionadas em lâminas de rotina e amostradas em novos blocos de parafina. Cilindros de 1,0mm da área tumoral obtidos pelo equipamento foram transferidos em duplicata para o novo bloco com posição bidimensional separados por espaços de 0,2mm,

determinados e gravados pelo equipamento. Deste novo bloco, chamado receptor, foram obtidos cortes histológicos realizados com micrótomo manual e transferidos em fita adesiva para as lâminas adesivas especiais (Instrumentics Inc., Hackensack, NJ, EUA). A fita adesiva foi retirada por exposição à luz ultravioleta, e as lâminas foram armazenadas cobertas por parafina, embaladas a vácuo e congeladas em freezer a -20°C.

3.4 ENSAIOS IMUNOISTOQUÍMICOS EM CORTES CONVENCIONAIS

As reações em lâminas convencionais foram feitas de forma automatizada no Autostainer DAKO®.

A deparafinização foi realizada através de lavagens em xilol, reidratação em álcool etílico seguida de lavagem em água corrente. Posteriormente, a recuperação antigênica foi feita por calor úmido em panela de pressão a 98°C por quinze minutos em tampão citrato (pH 6.0).

As lâminas foram colocadas no equipamento e, de acordo com o tamanho e posição dos cortes, foi delineado um programa com a quantidade de reagente determinada para cada lâmina. Primeiro, ocorreu o bloqueio de peroxidase endógena pela adição de água oxigenada 30 volumes por duas vezes, durante sete minutos. As lâminas foram lavadas com tampão PBS Tween 1x e em seguida foi adicionado Dako Protein Block Serum-Free durante vinte minutos, para bloqueio de proteínas inespecíficas. Os anticorpos foram então adicionados e incubados por dois horas.

A amplificação do sinal ocorreu por sistema de polímero (DAKO). Após lavagens, o sistema de polímero foi adicionado; primeiro o DAKO Advanced Link por trinta minutos e, após nova lavagem, o DAKO Advanced Enzyme por mais trinta minutos. As lâminas foram coradas com 3,3'diaminobenzidina (DAB) por cinco minutos, e contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto. As lâminas foram montadas no equipamento Tissue-Tek®FILM (Sakura®). As reações foram sempre acompanhadas de dois controles positivos; um em tecido sabidamente positivo já padronizado pela rotina do hospital, e outro em caso de tumor de pênis identificado como positivo nas reações em TMA.

3.5 ENSAIOS IMUNOISTOQUÍMICOS NOS *TISSUE MICROARRAYS*

Lâminas de TMA foram submetidas à incubação a 60°C por uma hora a fim de retirar a camada protetora de parafina. A deparafinização foi realizada de forma idêntica à descrita no item 3.4, seguida por recuperação antigênica realizada através de calor úmido em panela de pressão a 98°C por quinze minutos em tampão citrato (pH 6.0). A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada em três banhos, por cinco minutos cada, em água oxigenada 30 volumes. Posteriormente, foram adicionados 100µL de Dako Protein Block Serum-Free em cada lâmina durante vinte minutos. A imunorreação ocorreu à temperatura ambiente com a incubação com os anticorpos primários específicos durante duas horas em câmara úmida.

Após sucessivas lavagens em tampão PBS, foram incubados 100µL de DAKO Advanced Link por 30 minutos. Novas lavagens foram feitas com tampão PBS e foram adicionados 100µL de DAKO Advanced Enzyme por trinta minutos. Após novas lavagens, as lâminas foram coradas 3,3'diaminobenzidina (DAB) por três a cinco minutos, e contra-coradas com hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas no equipamento Tissue-Tek®FILM (Sakura®). As reações foram sempre acompanhadas de controle positivo em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e um controle negativo, obtido pelo não uso do anticorpo primário durante a reação.

3.6 INTERPRETAÇÃO DAS ANÁLISES IMUNOISTOQUÍMICAS

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico comum e os resultados classificados em relação à intensidade da reação positiva. Para análise dos marcadores, usa-se a classificação recomendada pela ASCO/CAP para HER2, reconhecida pelo *Food and Drug Administration* (FDA), que descreve quatro categorias: (0), sem marcação ou marcação fraca de membrana em menos de 10% das células; (1+), marcação fraca e parcial em mais de 10% das células; (2+), marcação completa da membrana com intensidade moderada ou forte em mais de 10% das células neoplásicas, (3+), marcação forte e completa da membrana em mais de 30%. Amostras foram classificadas como negativas ou positivas, de acordo com os critérios da Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação da expressão imunoistoquímica dos marcadores HER, de acordo com intensidade e padrão de marcação.

Característica	Grau	Classificação
Nenhuma marcação/marcação fraca, <10% das células tumorais	0	Negativo
Marcação fraca em parte da membrana, >10% das células tumorais	1+	
Marcação completa de membrana, de intensidade fraca a moderada, >10% das células tumorais	2+	Positivo
Marcação forte, >10% das células tumorais	3+	

Na análise de HER1, para fins estatísticos, além desta forma de agrupamento, citada acima, chamada de EGFR I, duas outras formas de agrupamento foram utilizadas. Os casos 2+ ou *borderline* foram considerados como categoria intermediária, resultando em três classificações: positiva (3+), *borderline* (2+) ou negativa (1+ e 0), e este agrupamento foi denominado EGFR II, de acordo com critérios da Tabela 5.

Tabela 5 - Classificação da expressão imunoistoquímica de EGFR, de acordo com intensidade e padrão de marcação. Agrupamento EGFR II.

Característica	Grau	Classificação
Nenhuma marcação/marcação fraca, <10% das células tumorais	0	Negativo
Marcação fraca em parte da membrana, >10% das células tumorais	1+	
Marcação completa de membrana, de intensidade fraca a moderada, >10% das células tumorais	2+	<i>Borderline</i>
Marcação forte, >10% das células tumorais	3+	Positivo

Na análise seguinte, os casos *bordeline* foram considerados negativos, resultando novamente em duas categorias, positiva (somente casos 3+) ou negativa (2+, 1+ e 0) (EGFR III).

Tabela 6 - Classificação da expressão imunoistoquímica de EGFR, de acordo com intensidade e padrão de marcação. Agrupamento EGFR III.

Característica	Grau	Classificação
Nenhuma marcação/marcação fraca, <10% das células tumorais	0	Negativo
Marcação fraca em parte da membrana, >10% das células tumorais	1+	
Marcação completa de membrana, de intensidade fraca a moderada, >10% das células tumorais	2+	
Marcação forte, >10% das células tumorais	3+	Positivo

Para HER2, a marcação citoplasmática foi também considerada. Foram considerados positivos os casos que apresentavam marcação específica do citoplasma tumoral e negativos aqueles casos sem marcação.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística foi realizada através do programa SPSS for Windows 15.0, SPSS Inc. A distribuição das variáveis clínicas, anatomopatológicas e referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingências.

As associações entre variáveis qualitativas, expressão da família ErbB e presença de metástase linfonodal foram feitas com o teste do chi-

quadrado bicaudal. De acordo com os valores obtidos na tabelas 2x2, utilizou-se o valor do chi-quadrado bicaudal corrigido (Teste de Fisher).

A identificação dos fatores independentes relacionados com metástase linfonodal e com a expressão de EGFR e HER2 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.

A sobrevida global e câncer específica foram analisadas pelo estimador produto de limite de Kaplan e Meier, e a comparação entre as curvas através do teste de Log-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 e câncer específica foram selecionadas para análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p até 0,20.

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.

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

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 IMUNOISTOQUÍMICA DE EGFR

Os padrões de marcação de EGFR estão demonstrados na Figura 4.

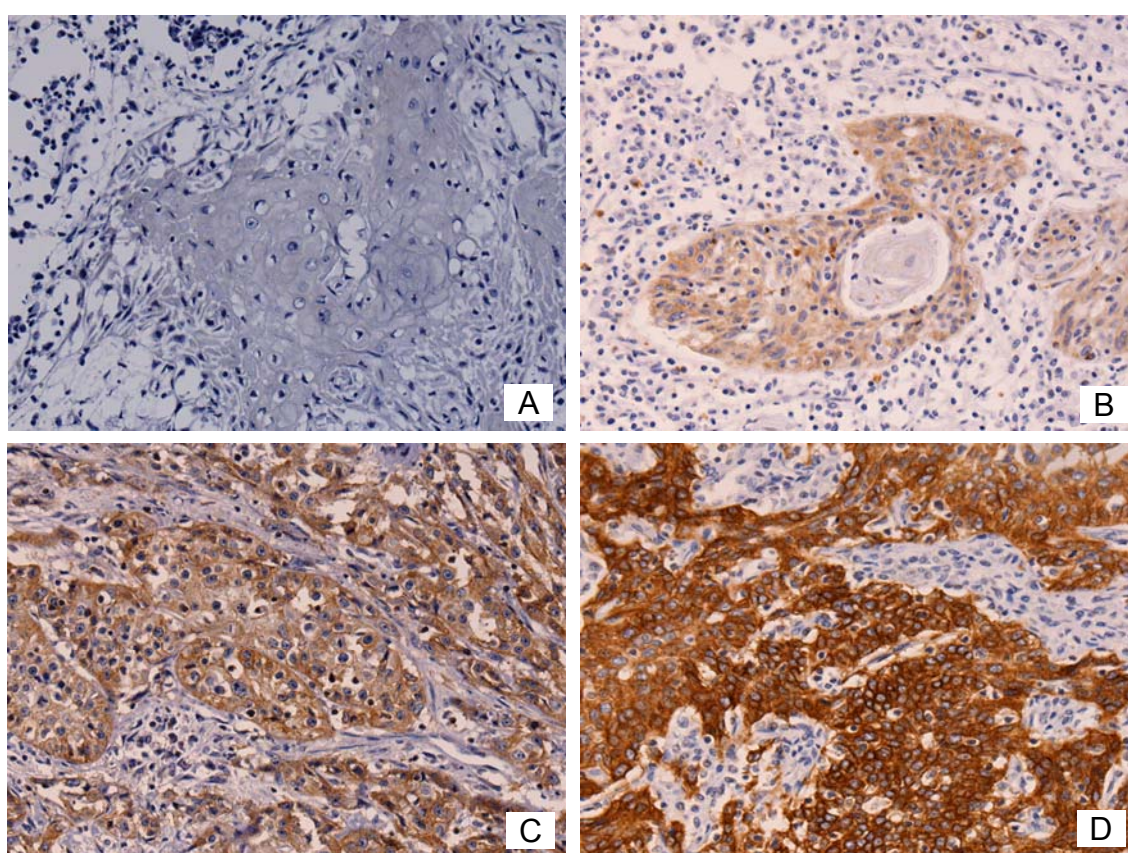


Figura 4 - Níveis de expressão de EGFR em carcinoma de pênis. A: Caso negativo (0). B: Caso negativo (1+). C: Caso *borderline* (2+). D: Caso positivo (3+), aumento original 400x.

No presente estudo, observou-se que 91 casos (48,4%) foram verdadeiramente positivos (3+) para EGFR, 61 casos (32,4%) *borderline* e 31 casos (16,4%) foram negativos. Dentre estes, 9 casos (4,8%) não apresentaram nenhuma marcação de membrana enquanto 22 (11,7%) foram considerados 1+, ou seja, apresentaram marcação fraca e parcial da membrana. Cinco casos (2,7%) não foram analisáveis devido a artefatos técnicos. Ao se considerarem grupos 2+ e 3+ como positivos, 80,8% da amostra válida apresentam marcação positiva.

As variáveis epidemiológicas, clínicas e patológicas foram relacionadas à expressão deste marcador. Usando os grupos EGFR I e EGFR II, nenhuma associação significativa foi encontrada entre as variáveis e as categorias de expressão (Tabela 1, Anexo 2 e Tabela 2, Anexo 2, respectivamente).

Quanto ao grupo EGFR III, observou-se relação significativa com a variável clínica recidiva ($p=0,031$), como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Expressão de EGFR de acordo com o agrupamento EGFRIII e sua associação com variáveis epidemiológicas, clínicas e patológicas.

Características	EGFR		P
	NEGATIVO	POSITIVO	
Idade			
Menor ou igual a 60 anos	55 (41,9%)	57 (50,9%)	0,762**
Maior de 60 anos	37 (52,1%)	34 (47,9%)	
Raça			
Branco	70 (51,1%)	67 (48,9%)	0,736**
Não branco	22 (47,8%)	24 (52,2%)	
Antecedentes Venéreos			
Não	31 (43,1%)	41 (56,9%)	0,431**
Sim	20 (51,3%)	19 (48,7%)	
Infecção por HPV			
Não	4 (33,3%)	8 (66,7%)	0,745**
Sim	21 (43,8%)	27 (56,3%)	
Estadio T			
T1	12(66,7%)	6 (33,3%)	0,214**
T2, T3 e T4	80 (48,5%)	85 (51,5%)	
Estadio N			
N0	54 (53,5%)	47 (46,5%)	0,371**
N1 – N2	37 (46,3%)	43 (53,8%)	
Grau Histológico			
Baixo	22 (51,2%)	21 (48,8%)	1**
Médio e Alto	69 (49,6%)	70 (50,4%)	
Invasão Vascular			
Não	71 (51,8%)	66 (48,2%)	0,477**
Sim	18 (43,9%)	23 (56,1%)	
Invasão Perineural			
Não	72 (55,8%)	57 (44,2%)	0,18**
Sim	17 (34,6%)	32 (65,4%)	
Invasão do Corpo Esponjoso			
Não	7 (50,0%)	7 (50,0%)	1**
Sim	70 (48,6%)	74 (51,4%)	
Invasão do Corpo Cavernoso			
Não	23 (45,1%)	28 (54,9%)	0,736**
Sim	50 (48,1%)	54 (51,9%)	
Invasão da Uretra			
Não	43 (51,8%)	40 (48,2%)	0,485**
Sim	24 (44,4%)	30 (55,6%)	
Recidiva			
Não	74 (55,2%)	60 (44,8%)	0,031**
Sim	18 (36,7%)	31 (63,3%)	

* Teste do chi-quadrado de Pearson, ** Teste exato de Fisher .

4.2 IMUNOISTOQUÍMICA DE HER2

Através do TMA, um caso que não estava incluído nos 188 casos previamente selecionados com material suficiente para ser avaliado por cortes convencionais foi escolhido como controle das reações. Foi o único caso que apresentou um padrão de marcação de membrana, como pode ser observado na Figura 5.

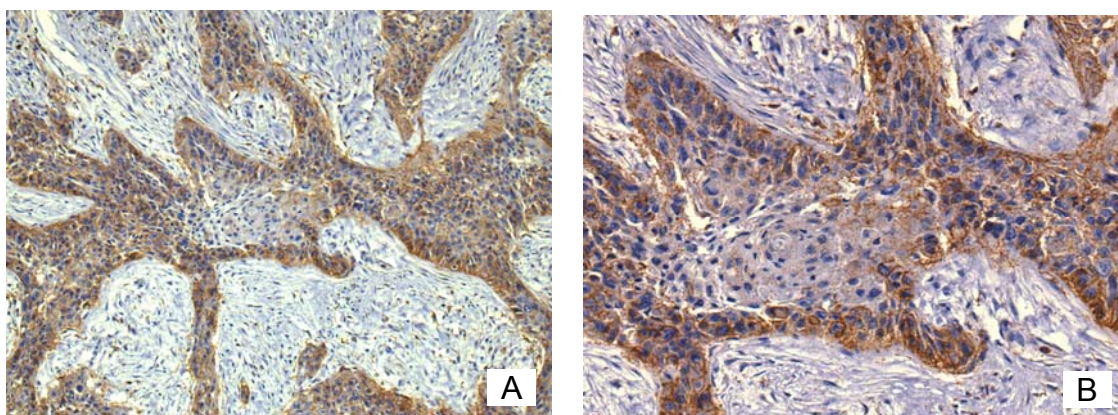


Figura 5 - Padrão de marcação positiva de HER2 em membrana em amostra de carcinoma de pênis. A: Aumento original 100x. B: Detalhe da marcação, aumento original 200x.

Em nossa amostra, não foi observado nenhum outro caso com marcação positiva em membrana para HER2. Todos os casos no presente estudo foram negativos para o marcador. Em alguns casos, porém, foi observada uma marcação citoplasmática que não parece ser artefato ou *background*. É uma marcação específica em células tumorais, que está ausente no tecido normal, conforme demonstra a Figura 6.

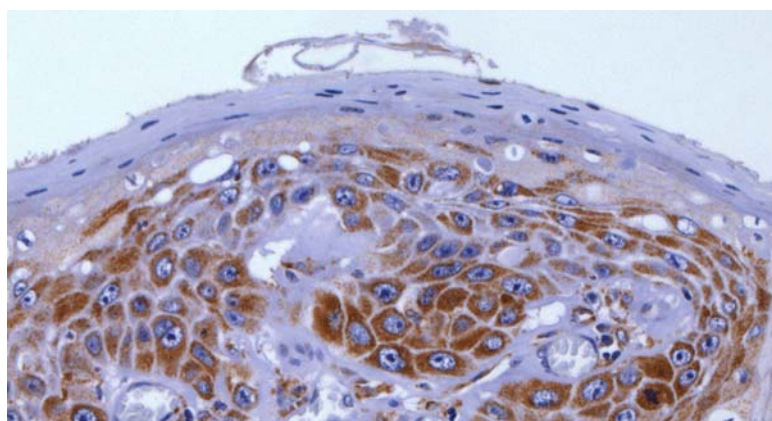


Figura 6 - Fotomicrografia da positividade para marcação citoplasmática de HER2 no tecido tumoral e sua ausência no tecido epitelial normal. Aumento original 200x.

Baseado nesta observação, os tumores foram classificados em negativos e positivos para a marcação citoplasmática de HER2, e os dois padrões estão apresentados na Figura 7.

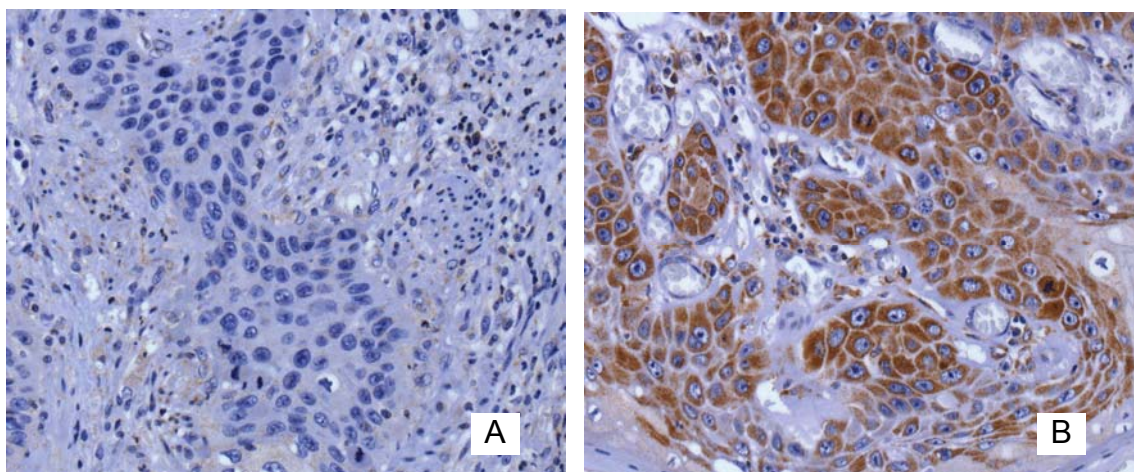


Figura 7 - Fotomicrografia de caso negativo (A) e um caso positivo (B) para a marcação citoplasmática de HER2 em tumores penianos. Aumento original 200x.

Foi observada positividade em 28 casos (14,9%), enquanto a maioria (85,1%) foi negativa também para esta localização do marcador.

A associação desta expressão citoplasmática de HER2 com as variáveis clínicas e patológicas está apresentada na Tabela 8. Houve associação significativa entre expressão e grau histológico, sendo que nenhum caso de baixo grau que apresentou marcação positiva.

Tabela 8 - Associação da marcação citoplasmática de HER2 e variáveis clínico-patológicas.

Características	HER2 citoplasmático		p
	NEGATIVO	POSITIVO	
Idade			
Menor ou igual a 60 anos	93 (80,9%)	22 (19,1%)	0,57**
Maior de 60 anos	67 (91,8%)	6 (8,2%)	
Raça			
Branco	118 (83,1%)	24 (16,9%)	0,23**
Não branco	42 (91,3%)	4 (8,7%)	
Antecedentes Venéreos			
Não	64 (86,5%)	10 (13,5%)	0,16*
Sim	38 (95,0%)	2 (5,0%)	
Infecção por HPV			
Não	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,257*
Sim	40 (83,3%)	8 (16,7%)	
Estadio T			
T1	1 (5,3%)	18 (94,7%)	0,214*
T2, T3 e T4	27 (16,0%)	142 (84,0%)	
Estadio N			
N0	15 (14,3%)	90 (85,7%)	0,837**
N1 – N2	13 (16,0%)	68 (84,0%)	
Grau Histológico			
Baixo	46 (100,0%)	0 (0,0%)	<0,001**
Médio e Alto	113 (80,1%)	28 (19,9%)	
Invasão Vascular			
Não	120 (85,1%)	21 (14,9%)	0,808**
Sim	35 (83,3%)	7 (16,7%)	
Invasão Perineural			
Não	115 (85,8%)	19 (14,2%)	0,492**
Sim	40 (81,6%)	9 (18,4%)	

Cont/Tabela 8

Características	HER2 citoplasmático		p
	NEGATIVO	POSITIVO	
Invasão do Corpo Esponjoso			
Não	16 (100%)	0 (0,0%)	0,080*
Sim	123 (83,7%)	24 (16,3%)	
Invasão do Corpo Cavernoso			
Não	45 (83,3%)	9 (16,7%)	0,815**
Sim	90 (85,7%)	15 (14,3%)	
Invasão da Uretra			
Não	73 (84,9%)	13 (15,1%)	1**
Sim	46 (85,2%)	8 (14,8%)	
Recidiva			
Não	117 (84,8%)	21 (15,2%)	1**
Sim	43 (86,0%)	7 (14,0%)	

* Teste do chi-quadrado de Pearson

** Teste Exato de Fisher

*** NA = Não avaliável

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA DE HER3

Nos ensaios realizados no TMA, não foi observada marcação de membrana em nenhum dos casos; porém alguma outra positividade para este marcador foi observada. A marcação citoplasmática ocorreu em 100% dos casos. Marcação nuclear também foi observada em alguns casos, porém esta não foi considerada para fins estatísticos (Figura 8).

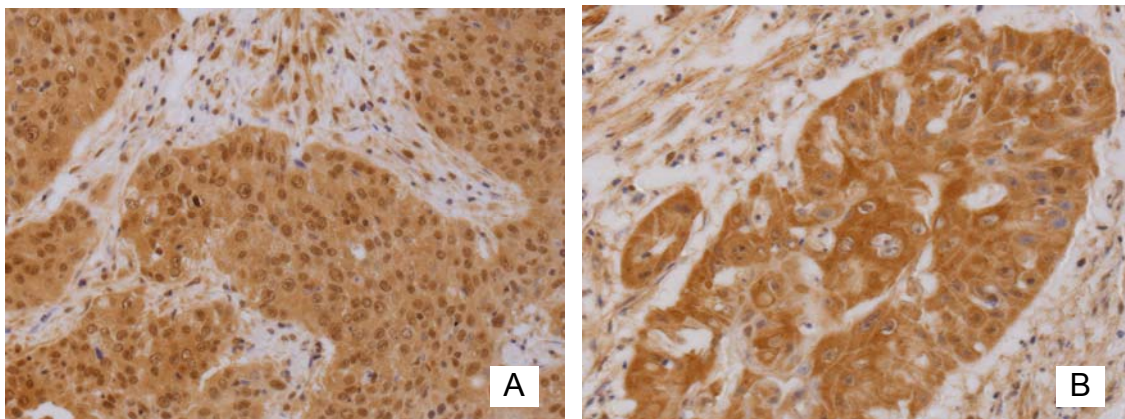


Figura 8 - Marcação de HER3 em carcinomas penianos. (A): citoplasma e núcleo positivos. (B): citoplasma positivo e núcleo negativo, aumento original 200x.

4.4 IMUNOISTOQUÍMICA DE HER4

Nenhum dos casos apresentou marcação de membrana para o marcador. Porém uma marcação citoplasmática foi observada em 100% dos casos. Por esta razão, este marcador não foi avaliado estatisticamente.

A Figura 9 representa o padrão de marcação citoplasmática e a ausência de marcação de membrana.

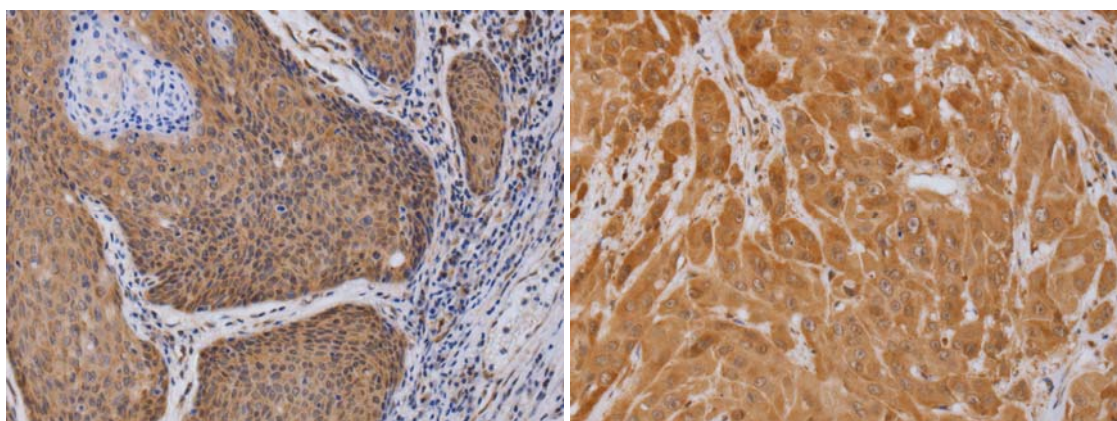


Figura 9 - Marcação citoplasmática de HER 4 em tumores penianos. Aumento original 200x.

4.5 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO LINFONODAL

Os dados clínico-patológicos foram associados à metástase linfonodal (Tabela 9). Houve correlação significativa entre a variável e o estadiamento N ($p=0,009$), invasão perineural ($p=0,001$) e invasão vascular ($p=0,034$).

Tabela 9 - Associação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos com metástase linfonodal.

Características	LINFONODO NEGATIVO	LINFONODO POSITIVO	p
Idade			
Menor ou igual a 60 anos	18 (35,3%)	33 (64,7%)	0,787**
Maior de 60 anos	8 (40,0%)	12 (60,0%)	
Raça			
Branco	22 (40,0%)	33 (60,0%)	0,380**
Não branco	4 (25,0%)	12 (75,0%)	
Antecedentes Venéreos			
Sim	7 (50,0%)	7 (50,0%)	0,174*
Não	9 (29,0%)	22 (71,0%)	
Infecção por HPV			
Sim	17 (47,2%)	19 (52,8%)	0,162*
Não	2 (18,2%)	9 (81,8%)	
Estadio T			
T1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0,101*
T2, T3 e T4	23 (34,3%)	44 (65,7%)	
Estadio N			
N0	13 (65,0%)	7 (35,0%)	0,005**
N1 – N2	13 (26,0%)	37 (74,0%)	
Grau Histológico			
Baixo	7 (85,5%)	1 (12,5%)	0,002*
Médio e Alto	19 (30,2%)	44 (69,8%)	
Invasão Vascular			
Sim	4 (17,4%)	19 (82,6%)	0,034**
Não	22 (45,8%)	26 (54,2%)	

Cont/Tabela 9

Características	LINFONODO NEGATIVO	LINFONODO POSITIVO	p
Invasão Perineural			
Sim	6 (16,7%)	30 (83,3%)	0,001**
Não	20 (57,1%)	15 (42,9%)	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Sim	23 (39,0%)	36 (61,0%)	0,577*
Não	1 (25,0%)	3 (75,0%)	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Sim	15 (31,3%)	33 (68,8%)	0,255**
Não	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
Infiltração da Uretra			
Sim	7 (26,9%)	19 (73,1%)	0,267**
Não	13 (43,3%)	17 (56,7%)	
Bordas			
Regulares	5 (35,7%)	9 (64,3%)	0,923*
Irregulares	20 (36,4%)	35 (63,6%)	
Postectomia			
Relacionada ao câncer	4 (50,0%)	4 (50,0%)	0,553*
Não relacionada ao câncer	1 (20,0%)	4 (80,0%)	
Não realizada	15(37,5%)	25(62,5%)	

* Teste do chi-quadrado de Pearson

** Teste Exato de Fisher

*** NA = Não avaliável

4.5.1 EGFR e Envolvimento Linfonodal

O grupo EGFR I apresentou uma associação com risco de metástases nos linfonodos ($p=0,045$). Os dados estão apresentados na Tabela 10. Nas demais formas de agrupamentos (EGFR II e EGFR III), não foi observada associação significativa ($p=0,122$ e $p=0,212$, respectivamente).

Tabela 10 - Associação da positividade de EGFR com metástase linfonodal.

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

* Teste do chi-quadrado de Pearson

4.5.2 HER2 e Envolvimento Linfonodal

Não houve associação entre a marcação citoplasmática de HER2 e o risco de metástases linfonodais (Tabela 11).

Tabela 11 - Associação da positividade de HER2 com metástase linfonodal.

Marcador	LN NEGATIVO	LN POSITIVO	P
HER2			
Negativo	20 (34,5%)	38 (65,5%)	0,430*
Positivo	6 (46,2%)	7 (53,8%)	

* Teste do chi-quadrado de Pearson

4.5.3 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 12.

Tabela 12 - Variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.

Variável	P
Invasão Perineural	0,001
Grau Histológico	0,002
Estadio N	0,005
Invasão Vascular e Linfática	0,034
EGFRI	0,045
Estadio T	0,101
Infecção por HPV	0,162
Antecedentes Venéreos	0,174

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a invasão perineural (RR=6,477; IC 95% [2,0–20,8]), e estadiamento N (RR=4,623; IC 95% [1,3–15,7]) foram fatores independentes de risco para comprometimento metastático dos linfonodos (Tabela 13).

Tabela 13 - Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal em pacientes portadores de carcinoma de pênis.

Variáveis	RR	IC 95%	p
Invasão Perineural			
Não	1	Ref.	
Sim	6,477	2,0 – 20,8	0,002
Estadiamento N			
N0	1	Ref.	
N1 – N2	4,623	1,3 – 15,7	0,014

4.6 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

4.6.1 Sobrevida Câncer específica

A sobrevida livre de doença da população estudada foi 81,9% (Figura 10).

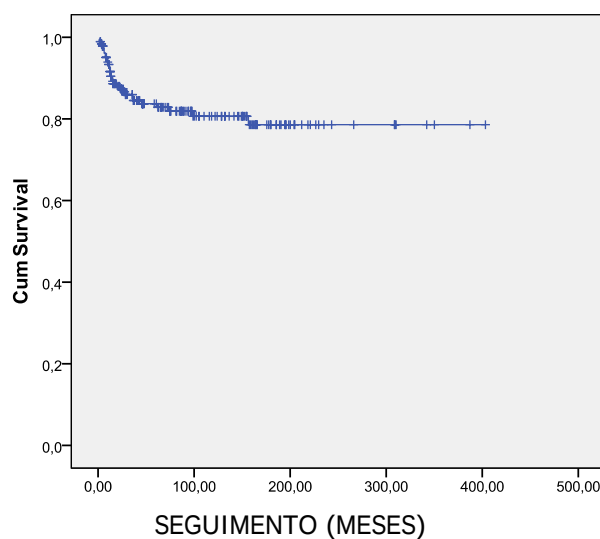


Figura 10 - Curva de sobrevida câncer específica para pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.

A. Análise Univariada

Em relação à sobrevida câncer específica, mostraram associação as variáveis estadiamento N ($p < 0,001$), invasão perineural ($p < 0,001$), recidiva ($p < 0,001$), grau histológico ($p = 0,001$), linfonodos positivos no exame patológico ($p = 0,027$) e estadiamento T ($p = 0,040$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Associação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos com sobrevida câncer específica em 05 anos.

Características	N	Sobrevida câncer específica em 5 anos (%)	p
Idade			
Menor ou igual a 60 anos	115	80,2	0,156*
Maior de 60 anos	73	88,9	
Raça			
Branco	142	84,0	0,327
Não branco	46	83,2	
Antecedentes Venéreos			
Não	74	85,7	0,101*
Sim	40	93,8	
Infecção por HPV			
Não	13	83,2	0,022*
Sim	48	82,2	
Estadio T			
T1	19	100	0,040*
T2, T3 e T4	169	81,7	
Estadio N			
N0	105	91,5	0,001*
N1 – N2	81	73,5	
Grau Histológico			
Baixo	46	97,8	0,001*
Médio e Alto	141	78,3	
Invasão Vascular			
Não	141	86,7	0,105*
Sim	42	73,1	
Invasão Perineural			
Não	134	89,5	<0,001*
Sim	49	65,6	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Não	16	93,3	0,273
Sim	147	84,7	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Não	54	84,1	0,626
Sim	105	82,1	
Infiltração da Uretra			
Não	86	83,2	0,733
Sim	54	76,5	

Cont/ Tabela 14

Características	N	Sobrevida câncer específica em 5 anos (%)	p
Linfonodos Positivos			
Não	26	85,5	0,027*
Sim	45	58,5	
Recidiva			
Não	138	96,2	<0,001*
Sim	50	37,1	
EGFR II			
Negativo	31	85,8	0,356
<i>Borderline</i>	61	87,7	
Positivo	91	79,1	
EGFR I			
Negativo	31	85,8	0,897
Positivo	152	82,8	
EGFR III			
Negativo	92	87,0	0,175*
Positivo	91	79,1	
HER2 citoplasmático			
Negativo	28	85,0	0,284
Positivo	160	77,4	

*Variáveis selecionadas para regressão logística

B. Análise Multivariada

Foram selecionadas para a análise multivariada todas as variáveis que atingiram valores de p até 0,20 na análise univariada para a sobrevida livre de doença (Tabela 15).

Tabela 15 - Variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.

Variável	P
Recidiva*	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Estadio N	0,001
Grau Histológico	0,001
Linfonodos Positivos	0,027
Antecedentes Venéreos	0,101
Invasão Vascular Linfática	0,105
Idade	0,156
EGFRIII	0,175

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o estadiamento N (RR=2,3; IC 95% [(1,0–5,1)] e a recidiva tumoral (RR=16,1; IC 95% [(6,6–38,8)] foram fatores independentes de risco para óbito por câncer (Tabela 16).

Tabela 16 - Risco de óbito por câncer em pacientes portadores de carcinoma peniano.

VARIÁVEIS	RR	IC 95%	P
Estadiamento N			
N0	1	Ref.	
N1 – N2	2,338	1,0-5,1	0,033
Recidiva			
Não	1	Ref.	
Sim	16,099	6,6-38,8	<0,001

Se a variável recidiva não entrar na análise, o estadiamento N (RR=3,2; IC 95% [(1,6–6,9)] e o grau histológico (RR=11,5; IC 95% [(1,5–85,0)] foram fatores independentes de risco para óbito por câncer (Tabela 17).

Tabela 17 - Risco de óbito por câncer em pacientes portadores de carcinoma peniano.

VARIÁVEIS	RR	IC 95%	P
Estadiamento N			
N0	1	Ref.	
N1 – N2	3,246	1,5-6,9	0,003
Grau Histológico			
Baixo	1	Ref.	
Médio e Alto	11,554	1,5-85,0	0,016

4.6.2 Sobrevida Global

A sobrevida global da população estudada foi 74,3% (Figura 11).

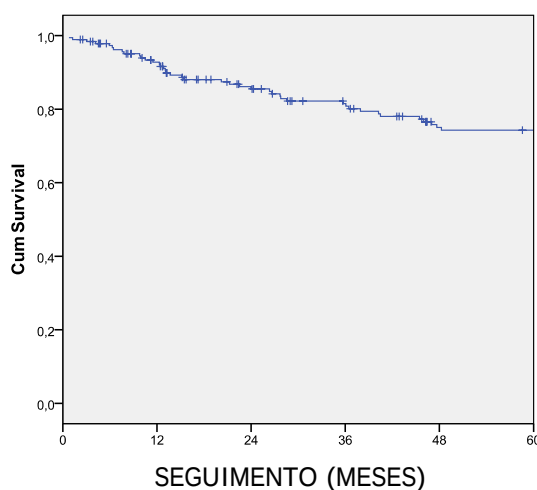


Figura 11 - Curva de sobrevida global para pacientes portadores de carcinoma peniano, não estratificada por nenhuma das variáveis estudadas.

A. Análise Univariada

Em relação à sobrevida global, mostraram associação as variáveis recidiva ($p < 0,001$), invasão perineural ($p < 0,001$), estadiamento N ($p < 0,001$), idade ($p = 0,001$), HER2 citoplasmático ($p = 0,007$), invasão vascular e linfática ($p = 0,013$), grau histológico ($p = 0,023$) e estadiamento T ($p = 0,036$) (Tabela 18).

Tabela 18 - Associação dos dados epidemiológicos, clínicos e patológicos com sobrevida global em 05 e 10 anos.

Características	N	SOBREVIDA GLOBAL		P
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Idade				
Menor ou igual a 60 anos	115	78,2	68,7	0,001
Maior de 60 anos	73	70,2	44,9	
Raça				
Branco	142	74,2	56,1	0,223
Não branco	46	74,5	63,2	
Antecedentes Venéreos				
Não	74	77,1	66,7	0,640
Sim	40	80,3	53,8	
Infecção por HPV				
Não	13	80,8	53,8	0,021
Sim	48	71,0	47,1	
Estadio T				
T1	19	100	88,9	0,036
T2, T3 e T4	169	71,2	54,3	
Estadio N				
N0	105	81,8	67,6	0,001
N1 – N2	81	64,0	42,5	
Grau Histológico				
Baixo	46	90	80,6	0,023
Médio e Alto	141	68,4	48,5	
Invasão Vascular				
Não	141	79,0	60,3	0,013
Sim	42	53,2	42,6	
Invasão Perineural				
Não	134	79,4	62,1	<0,001
Sim	49	57,0	39,7	
Infiltração do Corpo Esponjoso				
Não	16	93,3	93,3	0,056
Sim	147	76,1	55,9	
Infiltração do Corpo Cavernoso				
Não	54	80,2	69,2	0,300
Sim	105	70,6	49,1	
Infiltração da Uretra				
Não	86	76,6	64,5	0,783
Sim	54	68,3	49,8	
Linfonodos Positivos				
Não	26	76,5	41,8	0,056
Sim	45	50,4	34,6	

Cont/Tabela 18

Características	N	SOBREVIDA GLOBAL		P
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Recidiva				
Não	138	85,7	67,1	<0,001
Sim	50	32,5	23,2	
EGFR II				
Negativo	31	76,7	66,5	0,339
Borderline	61	78,4	57,5	
Positivo	91	68,7	51,5	
EGFR I				
Negativo	31	76,7	66,5	0,578
Positivo	152	73,0	54,2	
EGFR III				
Negativo	92	77,7	60,3	0,175
Positivo	91	68,7	51,5	
HER2 citoplasmático				
Negativo	28	77,0	63,0	0,007
Positivo	160	59,4	22,3	

A Figura 12 mostra o gráfico Kaplan-Meier demonstrando a relação entre HER2 citoplasmático e sobrevida global.

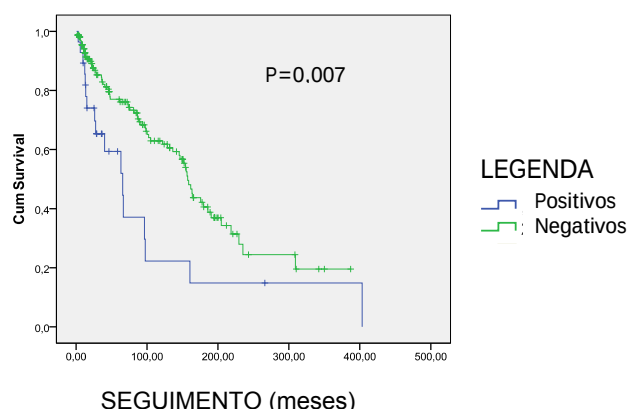


Figura 12 - Curva de sobrevida global para o marcador HER2 citoplasmático.

B. Análise Multivariada

Foram selecionadas para a análise multivariada todas as variáveis que atingiram valores de p até 0,20 na análise univariada para a sobrevida livre de doença (Tabela 19).

Tabela 19 - Variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.

Variável	P
Recidiva	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Estadio N	0,001
Idade	0,001
HER2 citoplasmático	0,007
Invasão Vascular	0,013
Infecção por HPV	0,021
Grau Histológico	0,023
Estadio T	0,036
Linfonodos Positivos	0,056
Infiltração do Corpo Esponjoso	0,056
Postectomia	0,060
EGFRIII	0,175

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a recidiva (RR=4,455; IC 95% [2,7–7,2]), idade (RR=1,718; IC 95% [1,7–4,3]), estadio N (RR=1,988; IC 95% [1,3–3,1]) e HER2 citoplasmático (RR=2,966; IC 95% [1,6–5,2]) foram fatores independentes para o risco de óbito (Tabela 20).

Tabela 20 - Risco de óbito em pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variáveis	RR	IC 95%	P
Recidiva			
Não	1	Ref.	
Sim	4,455	2,7-7,2	<0,001
Idade			
Menor ou igual a 60 anos	1	Ref.	
Maior de 60 anos	1,718	1,7-4,3	<0,001
Estadiamento N			
N0	1	Ref.	
N1 – N2	1,988	1,2-3,1	0,003
HER2 citoplasmático			
Negativo	1	Ref.	
Positivo	2,966	1,6-5,2	<0,001

Discussão

5 DISCUSSÃO

Apesar de raro em regiões desenvolvidas, o câncer de pênis representa um sério problema para países em desenvolvimento como o Brasil, sendo inclusive mais incidente que tumores de próstata e bexiga em algumas regiões (FAVORITO et al. 2008). Por esta razão, é essencial o empenho desses países na identificação de fatores de risco e prognósticos para a neoplasia. Poucos trabalhos se propuseram a avaliar os aspectos moleculares do carcinoma peniano, e nenhum deles obteve uma resposta definitiva para questões sobre a biologia e comportamento tumoral ou prognóstico dos pacientes (MUNNER et al. 2009).

As proteínas pertencentes à família ErbB são receptores de fator de crescimento que, ancoradas à membrana plasmática, permitem que a célula reconheça sinais solúveis e responda a eles. Recentemente, estudos vêm identificando estas proteínas também no citoplasma e núcleo celular, onde podem funcionar ativando vias intracelulares ou modulando a expressão gênica, estimulando o crescimento e proliferação (LIN et al. 2001, WELLS e MARTI 2002). A expressão destas proteínas está alterada em diversos tipos de neoplasias e é quase sempre associada a um pior prognóstico e maior agressividade tumoral. Por estas razões, a expressão destas proteínas foi avaliada no presente estudo.

Nos primeiros ensaios em *tissue microarrays* (TMAs), apenas um caso (0,28%) apresentou com positividade em membrana para o marcador

HER2 através do Herceptest® e, apesar de HER2 ser comumente mais expresso em adecarcinomas do que em carcinomas epidermóides (AZIZ et al. 2001), estes resultados preliminares levantaram dúvidas quanto à representatividade das amostras no TMA.

Os TMAs representam uma ferramenta importante e já bastante utilizada na pesquisa, principalmente, por apresentar grandes vantagens como a uniformização das reações, pois todos os cortes estão numa mesma lâmina; economia de reagentes e, conseqüentemente, redução de custos; e, ainda, uma vantagem ética pela preservação do material biológico do paciente, já que a técnica requer quantidades significativamente menores de amostras quando comparadas com cortes convencionais (ANDRADE et al. 2007). Foram, então, selecionados os casos com maior disponibilidade de material incluído em parafina para serem submetidos ao ensaio para avaliação de HER2 em lâminas convencionais. O único caso de membrana positiva não se encaixava neste critério e não foi incluído na estatística do estudo.

Confirmando-se os achados prévios no TMA, apesar das diversas tentativas de padronização e otimização das reações, nenhum outro caso de carcinoma peniano apresentou positividade para HER2 em membrana. Isto demonstra que os resultados obtidos pelo uso deste instrumento na rotina de *screening* e pesquisa são altamente precisos e confiáveis.

Segundo critérios ASCO/CAP, HER2 deve ser avaliado quanto à marcação de membrana, sendo desconsiderada qualquer marcação citoplasmática (BILOUS et al. 2003), apesar de alguns estudos terem

demonstrado associação entre este tipo de marcação e um pior prognóstico (MOLINA et al. 2002).

No presente estudo, foi observada uma marcação citoplasmática bastante clara do receptor HER2 em 14,9% das amostras. A marcação é forte, específica em células tumorais e ausente em células normais, não sendo artefato técnico ou marcação inespecífica, e foi avaliada estatisticamente. Dentre as variáveis clínicas e patológicas consideradas, este padrão de marcação apresentou associação altamente significativa com grau histológico ($p < 0,001$), sendo que todas as amostras de baixo grau apresentaram marcação negativa.

Tumores de baixo grau já foram associados com menor risco de desenvolvimento de metástase linfonodal (SLATON et al. 2001; VELAZQUEZ et al. 2009) e são, portanto, considerados como melhor prognóstico. A marcação citoplasmática de HER2 associada a casos de alto grau seria um indicativo de que estes seriam tumores mais agressivos. Reforçando esta idéia, foi observada também uma associação estatisticamente marginal entre a marcação e maior invasão do corpo esponjoso ($p = 0,08$).

Ainda corroborando com a idéia de agressividade, a marcação mostrou associação estatisticamente significativa com sobrevida global ($p = 0,007$), associação esta que se manteve na análise multivariada, mostrando um risco quase 3 vezes maior de óbito em pacientes HER2 positivos ($p \leq 0,001$). No presente estudo, portanto, a marcação de HER2 em

citoplasma foi um fator de risco independente para óbito. Outros fatores de risco independentes para óbito foram recidiva, idade e estadiamento N.

Na literatura, não há relatos sobre a expressão de HER2 em tumores penianos seja expressão na membrana ou no citoplasma.

Em tumores de mama, entretanto, além da importância da positividade em membrana, que já é muito bem estabelecida na literatura, a presença de fragmentos citoplasmáticos de HER2 já foi associada a maior risco de metástase linfonodal, sugerindo um possível papel na avaliação de prognóstico (MOLINA et al. 2002).

Em estudo com cultura de células CHO, linhagem frequentemente usada para estudos de transfecção e expressão proteica, ANIDO et al. (2006) identificaram que fragmentos da porção C-terminal (FCTs) da proteína HER2 encontrados no citoplasma e eventualmente no núcleo são capazes de promover e induzir a carcinogênese. Analisando o perfil eletroforético dos FCTs, os autores perceberam dois padrões de migração; um de maior peso molecular, que provavelmente contém também a porção transmembrana, e um de menor peso, contendo apenas a porção citoplasmática solúvel. Como é a porção citoplasmática que possui atividade tirosina-cinase, os autores sugerem que estes fragmentos sejam capazes de fosforilar proteínas citoplasmáticas e ativar vias de proliferação como PI3k e Akt/MAPK (ANIDO et al. 2006). Mesmo fragmentadas, FCTs de HER2 apresentam atividade cinase e podem ser ativadas. Sua participação no desenvolvimento de tumores já foi demonstrada, podendo estar envolvida ainda na resistência ao tratamento com Herceptin® (ANIDO et al. 2006).

No presente estudo, o anticorpo utilizado nos ensaios imunistoquímico foi o clone CB11 (Leica®), que reconhece um epitopo localizado próximo à região carboxiterminal da proteína, região que fica solúvel no citoplasma. Ensaios posteriores utilizando anticorpos que não reconheçam especificamente a porção citoplasmática de HER2 são necessários para confirmar se é apenas esta porção do receptor que está presente nestes tumores. Ainda, analisar o perfil de expressão de MMPs e outras enzimas proteolíticas pode justificar a presença de FCTs no citoplasma e não na membrana celular, caso estes sejam gerados por clivagem proteolítica. Caso os FCTs sejam gerados por alteração do início da transcrição, ensaios de Northern Blot mostrariam a variedade de mRNAs sendo gerados a partir do gene HER2.

Através de ensaios de Western Blot ou ELISA, analisando separadamente as proteínas hidrofílicas (solúveis no citoplasma) e hidrofóbicas (aderidas à membrana), seria possível detectar-se a presença do receptor em cada fração. Através da comparação do padrão de migração das bandas geradas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e confirmadas por Western Blot, seria possível ainda verificar-se a diferença de peso molecular, se existente, entre as proteínas citoplasmáticas e de membrana.

Os resultados de imunistoquímica com outros anticorpos, aliados às análises de Western Blot e SDS-PAGE, podem esclarecer se há no citoplasma apenas FCTs ou o receptor HER2 em sua forma integral.

Contudo, os resultados aqui apresentados reforçam a importância de se considerar a marcação citoplasmática de HER2 na avaliação do prognóstico de paciente e ainda nos critérios de seleção de pacientes para terapia alvo baseada em inibidores tirosina-cinase, uma vez que, mesmo estando o receptor fragmentado, seu domínio catalítico parece estar funcional e participar ativamente na proliferação e crescimento do tumor.

Quanto à expressão de EGFR, a avaliação também foi feita em cortes convencionais. Neste caso, a expressão deste marcador especificamente é bastante heterogênea dentro de um mesmo tumor, sendo uma expressão forte em células basais e, à medida que ocorre a diferenciação tumoral, o marcador vai perdendo a expressão. De forma geral, as regiões escolhidas para serem amostradas no TMA são exatamente aquelas onde há maior diferenciação, e, no caso da avaliação de EGFR, isto representaria um viés de seleção. Seria necessário então que fossem selecionadas as áreas do fronte de invasão tumoral, e isto permitiria análise confiável das marcações observadas.

A análise pela técnica de imunoistoquímica, porém, é bastante subjetiva. Para o marcador EGFR, por exemplo, os autores utilizam diferentes critérios para classificar casos positivos e negativos. A falta de padronização de categorias intermediárias, que utilizam escores de marcação, pode comprometer a comparação entre resultados de estudos diferentes. Neste trabalho, foi escolhido analisar-se a marcação EGFR utilizando a padronização existente para HER2 de acordo com os critérios da ASCO/CAP. Entretanto, esta não é uma escolha universal.

A maioria dos casos neste estudo (49,7%) foi verdadeiramente positiva (3+) para EGFR. Casos *borderline* representaram 33,3% da amostra enquanto os casos negativos contaram 17%. Ao se associarem casos 2+ e 3+, observa-se positividade em 83% da amostra. Considerando-se qualquer marcação como positiva (isto é, considerando-se casos 1+, 2+ ou 3+ como positivos), a taxa de positividade seria de 95%.

Dois estudos na literatura reportaram a expressão de EGFR em carcinoma peniano. Os autores consideraram positivos os casos com marcação 1+, 2+ ou 3+ e observaram positividade em 90%-100% dos 45 e 17 casos avaliados, respectivamente (BÖRGERMANN et al. 2009, LAVENS et al. 2010). Em outros tumores epidermóides, a expressão de EGFR é frequente, especialmente em células escamosas de canal anal (100%), cabeça e pescoço (72-100%), colo de útero (90%), rins (50-90%), esôfago (43-89%), células não pequenas de pulmão (62%) e próstata (40-80%) (HIRSCH et al. 2003; HARARI et al. 2004; LÊ et al. 2005; RYOTT et al. 2009). Até o presente momento, porém, apesar da alta taxa de expressão deste marcador nos diversos tipos tumorais, há relatos de forte associação entre a marcação e menor sobrevida apenas em tumores de cabeça e pescoço, colo uterino e esôfago (NICHOLSON et al. 2001).

Dentre todas as variáveis clínicas e patológicas avaliadas no presente estudo, tumores positivos (casos 2+ e 3+) apresentaram associação inversa significativa com metástase linfonodal ($p=0,045$); isto é, a maioria dos casos com linfonodos negativos foram positivos para a marcação de EGFR. Neste caso, ao contrário do que seria esperado baseado em relatos da literatura,

os tumores EGFR positivos apresentariam um efeito protetor para o desenvolvimento de metástases linfonodais. Porém apenas um caso linfonodo negativo foi negativo para a marcação. E ainda, apenas 11 casos negativos para EGFR foram submetidos à linfadenectomia e avaliados patologicamente.

Porém, ao considerar-se individualmente apenas a categoria 3+ como verdadeiramente positiva, foi observada uma relação entre a marcação de EGFR e recidiva tumoral ($p=0,031$).

Na literatura, não foram reportadas associações significativas entre a expressão de EGFR e características clínicas e patológicas no carcinoma peniano (BÖRGERMANN et al. 2009, LAVENS et al. 2010).

O *status* gênico de EGFR, avaliado através do método de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), pode representar uma ferramenta importante no prosseguimento do presente estudo, pois, se amplificado, pode justificar a alta taxa de expressão deste marcador na presente casuística. Caso o gene não esteja amplificado, a superexpressão deve-se possivelmente a alterações no processamento do mRNA ou tradução proteica, sendo necessários, neste caso, ensaios de *real time* PCR para avaliar perfil de expressão gênica.

EGFR é um importante alvo terapêutico em diversos tumores. As duas principais abordagens de tratamento são a terapia baseada em anticorpos, que consiste no uso de anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos da região extracelular do receptor. O complexo formado é internalizado, degradado e a via do EGFR é inibida, podendo ainda ocorrer

ativação de resposta imune; e a terapia baseada em inibidores, que se ligam à porção intracelular do receptor e bloqueiam sua atividade tirosina-cinase (HARARI et al. 2004). As principais ferramentas para seleção de pacientes para terapia baseada em inibidores são análise de amplificação gênica através de FISH e análise de mutações gênicas que geram um ganho de função. Pacientes que possuem mutação mostraram melhores respostas em estudos com diversos tipos tumorais, porém o *endpoint* do tratamento deve ser considerado. Em pacientes com doença metastática, por exemplo, onde a cura não é mais alcançável, o aumento da sobrevida deve ser considerado como *endpoint* de resposta. Neste caso, a imunoistoquímica é um bom instrumento na seleção de pacientes (CAPPUZZO 2008). Em tumores de células escamosas de cabeça e pescoço, a superexpressão proteica e não a análise da mutação no gene pode ser decisiva na resposta à terapia (SHEIKH-ALI et al. 2008).

Não há estudos que demonstrem o status gênico de EGFR no carcinoma de pênis.

Na análise de HER4, não foi observada marcação de membrana em nenhum caso; entretanto, houve marcação citoplasmática de HER4 em 100% das células, e, por isto, não foi possível realizarem-se as análises estatísticas. Apesar da alta porcentagem, a marcação observada foi clara e não ocorreu por artefatos técnicos, e, por esta razão, talvez represente um alvo para terapia. Caso estes receptores estejam formando dímeros com os demais receptores e ativando cascatas de proliferação intracelulares, a

inibição deles representaria uma significativa redução na sinalização, já que estão presentes em 100% da amostra.

A marcação citoplasmática de HER4 já foi relatada e elucidada na literatura. Estudos demonstraram que o mecanismo de clivagem proteolítica da região extracelular libera no citosol o seu domínio intracelular solúvel (4ICD) (NI et al. 2001). Esta fração pode tanto acumular-se na mitocôndria e promover apoptose da célula tumoral, confirmando relatos da atividade anti-tumorigênica de HER4, quanto ser translocada ao núcleo, neste caso promovendo proliferação celular, especialmente em tumores de mama positivos para receptor de estrógeno (KOUTRAS et al. 2009). No presente estudo, nenhuma marcação nuclear foi observada.

Já a avaliação de HER3 no presente trabalho ficou comprometida. Como é um marcador pouco utilizado na rotina, sua padronização é mais difícil e, apesar dos vários testes e tentativos, não foi possível observar-se marcação clara como nos demais. Todos os casos apresentaram marcação inespecífica do estroma tumoral, comprometendo as análises. Ainda, todos os casos apresentaram marcação citoplasmática e alguns apresentaram ainda marcação nuclear. Porém, pela falta de confiabilidade nas marcações observadas, estes dados não foram avaliados estatisticamente.

A superexpressão de HER3 é geralmente associada a tumores que superexpressam HER1 ou, na maioria dos casos, HER2, provavelmente formando heterodímeros com estes membros da família. A coexpressão de HER2 e HER3 em carcinomas mamários é de grande importância. Vários

estudos têm apontado o papel deste dímero não só na carcinogênese como também na resistência a drogas (HSIEH e MOASSER 2007).

Estudos mostraram que este receptor possui uma isoforma solúvel, p85, que ocorre naturalmente e se liga com alta afinidade a NRGs, inibindo a ativação dos demais receptores por esta via (KOUTRAS et al. 2009).

Quanto à marcação nuclear, o ligante NRG parece poder translocar HER3 ao núcleo graças a uma alteração no equilíbrio de fosforilação e defosforilação deste receptor na membrana plasmática. Este fato explica esta localização celular e pode representar um importante alvo para se superar a resistência de terapias baseada em inibidores (OFFTERDINGER et al. 2002).

Em trabalhos que relatam a expressão dos receptores HER3 e HER4 em algum tipo tumoral, frequentemente, a micrografia da marcação tumoral não é apresentada (MEMON et al. 2006; STEFFENSEN et al. 2008). Em trabalhos onde a micrografia aparece, apesar de ser discutida a marcação de membrana durante o texto, ela não pode ser observada de forma clara nas micrografias (SASSEN et al. 2008). Isto dificulta comparações entre os estudos.

Como já foi dito, as metástases nos linfonodos constituem atualmente o principal fator prognóstico na neoplasia peniana. Por causa da dificuldade da avaliação desta condição durante o exame clínico, é importante a busca de associação desta condição com variáveis patológicas e marcadores moleculares com o intuito de facilitar a escolha da conduta terapêutica a ser adotada. Alguns fatores de risco independentes para envolvimento linfonodal

já foram descritos; dentre eles, a presença de embolização vascular linfática e venosa (LOPES et al. 1996), grau histológico (FICARRA et al. 2002), estadiamento N (CAMPOS et al. 2006), padrão de invasão tumoral (GUIMARÃES et al. 2006) e invasão perineural (VELAZQUEZ et al. 2008).

Na presente casuística, a embolização vascular no exame patológico foi observada em 45 pacientes, representando 63,4% dos 71 submetidos à linfadenectomia e 23,9% da amostra total. Os tumores de alto grau representaram 38,5% da amostra, os de grau intermediário representaram 36,9% e os de baixo grau 24,6%. Tumores em estadio N0 foram mais frequentes (55,9%), seguidos por N2 (22,9%) e N1 (20,2%). A invasão perineural foi observada em 134 casos (73,2%). O padrão de invasão tumoral não foi considerado no presente estudo.

Em acordo com a literatura, as variáveis invasão perineural e estadio N foram consideradas fatores de risco independentes para metástase linfonodal (CAMPOS et al. 2006; VELAZQUEZ et al. 2008). No nomograma proposto por VELAZQUEZ et al (2008), o risco de metástases linfonodais para tumores de grau 1 que não apresentam invasão perineural é de 0%; se, nos mesmos tumores, for observada a invasão perineural, o risco cresce significativamente para 18%. Sem se considerar cada grau separadamente, o presente estudo demonstrou que o risco para pacientes com invasão perineural é 6,44 vezes maior do que para pacientes sem invasão (IC 95% [2,0–20,8]; $p=0,002$), reafirmando a importância desta variável no comportamento tumoral.

Quanto ao estadiamento, neste trabalho, o risco observado foi 4,62 vezes maior para pacientes em estádios N1 ou N2, quando comparados com o estádio N0 (IC95% [1,3– 15,7]; $p= 0,014$), semelhante ao já descrito anteriormente, de 5,05 ($p=0,001$) (CAMPOS et al. 2006).

Portanto, este trabalho, além de validar variáveis clínicas e patológicas já associadas a pior prognóstico no carcinoma peniano – embolização venosa, grau histológico e estadiamento clínico N (LOPES et al. 1996, SLATON et al. 2001, GUIMARÃES et al. 2006, CAMPOS et al. 2006, VELAZQUEZ et al. 2008) – ainda demonstrou que a família ErbB pode representar uma via importante na carcinogênese peniana. Este estudo abre caminhos para que as vias ativadas por estes receptores sejam investigadas nesta neoplasia e se tornem até alvo de terapias, além de explicar muito da biologia destes tumores sobre os quais pouco se sabe do ponto de vista molecular.

Mais uma vez, é necessário ressaltar-se a importância da participação dos países com maior incidência na busca por fatores moleculares que elucidem o comportamento dos tumores penianos, a fim de que esta doença, tão menosprezada pelo sistema de saúde pública atual, fique mais esclarecida e, dessa forma, mais facilmente combatível.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, foram observadas algumas associações significativas entre os níveis de expressão das proteínas da família ErbB e os aspectos clínicos e patológicos das amostras analisadas de carcinoma peniano.

1. Houve uma marcação citoplasmática clara e específica de HER2 que mostrou correlação significativa com grau histológico em análise univariada, e também com sobrevida global em análises univariada e multivariada, conferindo um comportamento mais agressivo dos tumores positivos.
2. A positividade 3+ de EGFR mostrou associação significativa com recidiva e, contraditoriamente, a positividade 2+ e 3+ demonstrou associação inversamente significativa com metástase linfonodal, indicando, no segundo caso, um efeito protetor da positividade.
3. A expressão de HER4 foi negativa em membrana e positiva em citoplasma em todos os casos.

Referências

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade VP, Cunha IW, Silva ES, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Angiero F, Sordo RD, Dessy E, et al. Comparative analysis of c-erbB-2 (HER-2/neu) in squamous cell carcinoma of the tongue: does over-expression exist? And what is its correlation with traditional diagnostic parameters? **J Oral Pathol Med** 2008; 37:145-50.

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

Aziz SA, Pervez S, Khan S, Kayani N, Azam SI, Rahbar MH. Significance of immunohistochemical c-ErbB-2 product localisation pattern for prognosis in human breast cancer. **Pathol Oncol Res** 2001; 7:190-6.

Baiocchi G, Lopes A, Coudry RA, Rossi BM, Soares FA, Aguiar S, Guimarães GC, Ferreira FO, Nakagawa WT. ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. **Int J Colorectal Dis** 2009; 24:1059-68.

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:463-75.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. **Bioquímica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2008. O plano molecular da vida; p.401-3.

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.

Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. **Mod Pathol** 2003; 16:173-82.

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

Börgermann C, Schmitz KJ, Sommer S, Rubben H, Krege S. Characterization of the EGF receptor status in penile cancer: Retrospective analysis of the course of the disease in 45 patients. **Urologe A** 2009; 48:1483-9.

Busby JE, Pettaway CA. What's new in the management of penile cancer? **Curr Opin Urol** 2005; 15:350-7.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. **Mol Cell** 2003; 12:541-52.

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

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

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

Citri A, Yarden Y. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:505-16.

Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. **Exp Cell Res** 2003; 284:54-65.

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

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

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

Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2000; 205:189-93.

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

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

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

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

Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. **Head Neck** 2003; 25:67-73.

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.

Grünwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:851-67.

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

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

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

Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. **Endocr Relat Cancer** 2004;11:689-708.

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

Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. **Exp Cell Res** 2003; 284:99-110.

Horenblas S, van Tinteren H, Delemarre JF, et al. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. **J Urol** 1993; 149:492-7.

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

Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. **Br J Cancer** 2007; 97:453-7.

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

Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:177-84.

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

Kazkayasi M, Hücümenoğlu S, Siriner GI, Hücümenoğlu M. Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2001; 258:329-35.

Komar AA, Hatzoglou M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. **J Biol Chem** 2005; 280:23425-8.

Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrri A, et al. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. **BMC Cancer** 2006; 6:46.

Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2009 May 29. [Epub ahead of print]

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

Lê LH, Chetty R, Moore MJ. Epidermal growth factor receptor expression in anal canal carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2005; 124:20-3.

Lee H, Akita RW, Sliwkowski MX, Maihle NJ. A naturally occurring secreted human ErbB3 receptor isoform inhibits heregulin-stimulated activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4. **Cancer Res** 2001; 61:4467-73.

Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nat Cell Biol** 2001; 3:802-8.

Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ, Haugk B, Leonard RC, Angus B. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. **J Clin Pathol** 2003; 56:300-4.

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

Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, et al. Prognostic factors in carcinoma of penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. **J Urol** 1996; 156:1637-42.

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

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

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

Martins AC, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci S Jr. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. **J Urol** 2002; 167:89-92; discussion 92-3.

Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. **Endocr Relat Cancer** 2001; 8:3-9.

Memon AA, Sorensen BS, Meldgaard P, Fokdal L, Thykjaer T, Nexø E. The relation between survival and expression of HER1 and HER2 depends on the expression of HER3 and HER4: a study in bladder cancer patients. **Br J Cancer** 2006; 94:1703-9.

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

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

Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene** 2007; 26:6469-87.

Molina MA, Sáez R, Ramsey EE, et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:347-53.

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

Narayama AS, Olney LE, Loening AS, et al. Carcinoma of the penis: analysis of 219 cases. **Cancer** 1982; 49:2185-91.

Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. Gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. **Science** 2001; 294:2179-81.

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

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

Offterdinger M, Schöfer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. **J Cell Biol** 2002; 157:929-39.

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

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

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

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

Rowinsky EK. Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer. **Oncologist** 2003; 8 Suppl 3:5-17.

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. **Am J Pathol** 2001; 159:1211-8.

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

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

Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, Brockhoff G. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R2.

Sato-Kuwabara Y, Neves JI, Fregnani JHTG, Sallum RA, Soares FA. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. **BMC Cancer** 2009; 7:9:6.

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

Sheikh-Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, et al. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Sci** 2008; 99:1589-94.

Slaton JW, Morgenster 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.

Snitcovsky I, Brentani MM. Fatores de crescimento. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, Kowalski LP, editores. **Bases da oncologia**. 2 ed. São Paulo: Lemar; 1998. p.167-76.

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

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

Steffensen KD, Waldstrøm M, Andersen RF, et al. Protein levels and gene expressions of the epidermal growth factor receptors, HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors. **Int J Oncol** 2008; 33:195-204.

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

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

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

Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:697-702.

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

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur J Cancer** 2001; 37 Suppl 4:S3-8.

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

Anexas



Anexo 1 – Sistema de classificação do tumor de pênis – TNM, AJCC, 2010.

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

Anexo 2 – Associação de padrões de expressão de EGFR a variáveis epidemiológicas, clínicas e patológicas.

Tabela 1 - EGFR: Expressão de EGFR agrupada em negativo (1+ e 0) e positivo (2+ e 3+), e sua associação com variáveis epidemiológicas, clínicas e patológicas.

Características	EGFR		p
	NEGATIVO	POSITIVO	
Idade			
Menor ou igual a 60 anos	18 (16,1%)	94 (83,9%)	0,691**
Maior de 60 anos	13 (18,3%)	58 (81,7%)	
Raça			
Branco	24 (17,5%)	113 (82,5%)	0,823**
Não branco	7 (15,2%)	39 (84,8%)	
Antecedentes Venéreos			
Não	10 (13,9%)	62 (86,1%)	0,590**
Sim	7 (17,9%)	32 (82,1%)	
Infecção por HPV			
Não	1 (8,3%)	11 (91,7%)	0,386*
Sim	9 (18,8%)	39 (81,3%)	
Estadio T			
T1	3 (16,7%)	15 (83,3%)	0,971*
T2, T3 e T4	28 (17,0%)	137 (83,3%)	
Estadio N			
N0	21 (20,8%)	80 (79,2%)	0,167**
N1-N2	10 (12,5%)	70 (87,5%)	
Grau Histológico			
Baixo	6 (14,0%)	37 (86,0%)	0,674***
Intermediário e Alto	25 (18,0%)	114 (82,0%)	
Invasão Vascular			
Não	26 (19,0%)	111 (81,0%)	0,359**
Sim	5 (12,2%)	36 (87,8%)	
Invasão Perineural			
Não	25 (19,4%)	104 (80,6%)	0,376**
Sim	6 (12,2%)	43 (87,8%)	
Infiltração do Corpo Esponjoso			
Não	2 (14,3%)	12 (85,7%)	0,770*
Sim	25 (17,4%)	119 (82,6%)	
Infiltração do Corpo Cavernoso			
Não	6 (11,8%)	45 (88,2%)	0,359**
Sim	19 (18,3%)	85 (81,7%)	
Infiltração da Uretra			
Não	15 (18,1%)	68 (81,9%)	1**
Sim	9 (16,7%)	45 (83,3%)	
Recidiva			
Não	25 (18,7%)	109 (81,3%)	0,378**
Sim	6 (12,2%)	43 (87,8%)	

* Teste do chi-quadrado de Pearson; ** Teste exato de Fisher.

Tabela 2 – EGFRII: Expressão de EGFR agrupada em três categorias e sua associação com variáveis epidemiológicas, clínicas e patológicas pelo teste do chi-quadrado de Pearson.

Características	EGFR			p
	NEGATIVO	BORDERLINE	POSITIVO	
Idade				
Menor ou igual a 60 anos	18 (16,1%)	37 (33,0%)	57 (50,9%)	NA***
Maior de 60 anos	13 (18,3%)	24 (33,8%)	34 (47,9%)	
Raça				
Branco	24 (17,5%)	46 (33,6%)	67 (48,9%)	NA***
Não branco	7 (15,2%)	15 (32,6%)	24 (52,2%)	
Antecedentes Venéreos				
Não	10 (13,9%)	21 (29,2%)	41 (56,9%)	NA***
Sim	7 (17,9%)	13 (33,3%)	19 (48,7%)	
Infecção por HPV				
Não	1 (8,3%)	3 (25%)	8 (66,7%)	0,669
Sim	9 (18,8%)	12 (25,5%)	27 (56,3%)	
Estadio T				
T1	3 (16,7%)	9 (50,5%)	6 (33,3%)	0,254
T2, T3 e T4	28 (17,0%)	52 (31,5%)	85 (51,5%)	
Estadio N				
N0	21 (20,8%)	33 (32,7%)	47 (46,5%)	0,321
N1-N2	10 (12,5%)	27 (33,8%)	43 (53,8%)	
Grau Histológico				
Baixo	6 (14,0%)	16 (37,2%)	21 (48,8%)	NA***
Intermediário e Alto	25 (18,0%)	44 (31,7%)	70 (50,3%)	
Invasão Vascular				
Não	26 (19,0%)	45 (32,8%)	66 (48,2%)	NA***
Sim	5 (12,2%)	13 (31,7%)	23 (56,1%)	
Invasão Perineural				
Não	25 (19,4%)	47 (36,4%)	57 (44,2%)	NA***
Sim	6 (12,2%)	11 (22,4%)	32 (65,4%)	
Infiltração do Corpo Esponjoso				
Não	2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50,0%)	0,925
Sim	25 (17,4%)	45 (31,3%)	74 (51,4%)	
Infiltração do Corpo Cavernoso				
Não	6 (11,8%)	17 (33,3%)	28 (54,9%)	NA***
Sim	19 (18,3%)	31 (29,8%)	54 (51,9%)	
Infiltração da Uretra				
Não	15 (18,1%)	28 (33,7%)	40 (48,2%)	NA***
Sim	9 (16,7%)	15 (27,8%)	30 (55,6%)	
Recidiva				
Não	25 (18,7%)	49 (36,6%)	60 (44,8%)	NA***
Sim	6 (12,2%)	12 (24,5%)	31 (63,3%)	

*** NA = Não avaliável