

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA E VALOR PROGNÓSTICO
DA CICLINA D1 NO CÂNCER DE PÊNIS**

ALVARO ALEXANDRE DIAS BOSCO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Stênio de Cássio Zequi

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

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Bosco, Alvaro Alexandre Dias

Análise da expressão imunoistoquímica e valor prognóstico da ciclina D1 no câncer de pênis / Alvaro Alexandre Dias Bosco – São Paulo, 2012.

100p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências

Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Descritores: 1. CÂNCER DE PÊNIS 2. IMUNOISTOQUÍMICA
3. CICLINA D1 4. TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESÊNQUIMA
5. PROGNÓSTICO. 6. RECÉM-NASCIDO 7. CARCINOMA *IN SITU*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Thereza e Alvaro, meus maiores exemplos e incentivadores. Assim como me deram o alicerce na vida me fizeram sonhar e deram asas para vôos mais altos. Como pais me protegeram mas me ensinaram a lutar. Sou grato por tudo que já fizeram por mim e pela nossa família.

Para a minha noiva Marcela, mulher que entrou na minha vida e me faz tentar ser melhor. É um exemplo de pessoa e profissional muito competente e dedicada. Não tenho dúvidas de que o tempo vai mostrar suas qualidades profissionais e tenho certeza de que formaremos uma bela família. Esteve comigo em todos os momentos, sem exceção. Cuidou de mim e do nosso casamento, nos momentos nos quais eu não pude estar presente. Superou-se. Surpreendeu-me. E continua me encantando dia após dia.

Às minhas irmãs Joseane e Juliane e ao meu cunhado Milton. Aqueles que compõem a minha família e me incentivaram e vibraram com as minhas conquistas. Também foram apoio para as horas ruins.

Aos meus avós Helena e Otávio (em memória) e Joelisa e Antônio. De origem muito humilde me ensinaram que para ser nobre, não é preciso título. São exemplos de pessoas honradas, honestas e sábias. Tenho a sorte de ter meus avós maternos presentes na minha vida. E nos momentos mais difíceis, pude aprender que não existe nada mais importante na vida, do que a própria vida. Aprendi que podemos lutar contra situações adversas com serenidade.

Aos meu sogros que me estimularam e se dispuseram a ficar longe da filha enquanto esta cuidava de mim.

Às minhas cunhadas (Fernanda e Camila) e respectivos maridos (Sérgio e Felipe) pelo apoio incondicional.

Aos meus sobrinhos Murilo e Henrique que alegraram muitos dos meus dias.
Sou mais feliz depois do nascimento deles.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Stênio de Cássio Zequi, que me abriu as portas de uma instituição séria e dedicada à pesquisa e permitiu que eu pudesse ter contato com a oncologia, despertando a curiosidade e paixão pelo assunto. Ajudou-me muito em todas as fases desta dissertação. Assim como o meu co-orientador, Prof. Dr Fernando Augusto Soares, que mesmo tendo tantos compromissos e atribuições, achou tempo para me ajudar a fazer um trabalho digno.

Ao Dr Gustavo Guimarães, chefe do Núcleo de Urologia, que primeiramente me possibilitou o convívio e foi exemplo de trabalho, dedicação e competência.

A todos os médicos do grupo da pelve que me ensinaram muitas coisas, não somente sobre câncer de pênis.

À enfermeira Thaís Safranov que me ajudou muito na aquisição do banco de dados. Sempre foi atenciosa, prestativa e competente.

Ao Dr Fernando Korkes que me auxiliou na obtenção de material necessário para a dissertação. Sua ajuda foi imprescindível. É um exemplo profissional, desde a época da residência de cirurgia geral.

Ao Dr Samuel Saiovici que também me auxiliou na obtenção de material para a dissertação. Assim como aos urologistas do Hospital Edmundo Vasconcelos, onde fiz residência em Urologia, por permitirem que eu pudesse fazer estágio em Oncologia no Hospital A.C. Camargo e me incentivaram para iniciar o mestrado: Dr Sandro Nassar, Dr Cláudio Almeida, Dr Néelson Gattás, Dr Fernando Dourado, Dr Fernando Almeida e Dr Maurício Almeida.

Ao Dr Walter Costa que me auxiliou com o processo de estatística e me ajudou no processo final da dissertação. Foi um prazer poder reencontrá-lo tantos anos depois do convívio que tivemos na infância, em Araçatuba.

À Sueli e ao Dr Rafael Malagoli Rocha que me ajudaram na confecção das lâminas e reações de imunoistoquímica.

À Eloisa que me auxiliou na organização do material que era extraído das cirurgias.

À Sra. Suely Francisco e Jefferson de Oliveira, colaboradores da biblioteca do Hospital A.C. Camargo por terem, por tantas vezes, conseguido o que eu julgava impossível. Trabalharam muito bem, com eficiência e simpatia.

Aos meus colegas de trabalho que tiveram compreensão do meu projeto e fizeram mais do que somente a sua parte para que eu pudesse terminar esta dissertação: Dr Gustavo Cuck, Dr Deusdedit Vieira da Silva, Dr Marco Antônio Caldas, Dr Marcelo Iwamoto, Dr Ravendra Moniz, Dr Victor Fanni, Dr Mário Casella, Dr André Costa Matos, Dr Sívio Pires, Dr Wladimir Franco, Dr Isaac Amselem, Dr Orlando Sanchis, Dr Adriano Pinto, Dr Marcelo Lorenzi e Dr Fábio Sepúlveda.

Aos colegas de pós-graduação que de forma indireta e direta me ajudaram a passar por todas as etapas necessárias com muito menos arranhões do que se eu estivesse percorrendo sozinho.

Ao Dr Francisco Cônsolo por permitir que eu pudesse ocupar um período de trabalho no Hospital de Aeronáutica de São Paulo para obter os créditos necessários.

Aos meus amigos não apenas da área médica que me encorajaram e deram apoio quando precisava ouvir e discutir sobre outros assuntos, diversos e mais agradáveis depois de tanto tempo de dedicação em um só tema: José Rodrigo Soza, Rodrigo Munhoz, Leonardo Mangili, Paulo Müller, André Mansano.

RESUMO

Bosco AAD. **Análise da expressão imunoistoquímica e valor prognóstico da ciclina D1 no câncer de pênis.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: São pontos fundamentais do tratamento para o câncer de pênis a cirurgia para tumor primário e a linfadenectomia regional. No entanto, esta última traz consigo uma alta morbidade. Por não existirem, até o momento, métodos diagnósticos acurados para o estadiamento clínico dos linfonodos regionais, as características clínicas e patológicas do tumor primário são levadas em consideração na tentativa de prever aqueles que realmente se beneficiarão de um procedimento cirúrgico. Marcadores biomoleculares estão sendo cada vez mais estudados e ainda não se demonstrou a real importância da Ciclina D1 no CaPe. **Objetivos:** Avaliar a expressão da Ciclina D1 no câncer de pênis em diferentes regiões: centro do tumor, frente de invasão, carcinoma *in situ* (CIS) peritumoral e no tecido não neoplásico e correlacionar com a metástase linfonodal, sobrevida global (SG) e sobrevida câncer específica (SCE). Comparar essa expressão com o tecido sadio não neoplásico de recém-nascidos. **Material e Métodos:** Foram avaliados, retrospectivamente, 143 casos de câncer de pênis, sendo obtidas informações demográficas, clínicas e patológicas através de banco de dados para a doença. Foram analisados também 10 prepúcios de recém-nascidos submetidos a postectomia perinatal. Um patologista experimentado procedeu a revisão de todos os casos e selecionou as áreas mais representativas dos blocos de parafina, a partir das quais procedeu-se secção para confecção de lâminas tradicionais contendo áreas tumorais e peritumorais. Utilizamos a técnica de imunoistoquímica, pela streptoavidina biotina peroxidase, para estabelecermos a positividade das regiões para Ciclina D1. Foram considerados positivos os casos com reação forte (3+), intermediária (2+) ou fraca (1+) caso estivessem presentes em mais de 10%

das células. **Resultados:** A expressão da Ciclina D1 foi semelhante nas diferentes regiões analisadas, somente apresentando maior expressão, comparativamente, no prepúcio dos recém-nascidos. A única associação estatisticamente significativa entre a expressão da Ciclina D1 e os fatores clínicos e patológicos foi com o grau de diferenciação tumoral no fronte de invasão, pela análise univariada ($p=0,026$). Não houve, no entanto, associação com metástase linfonodal ou piora da sobrevida global ou câncer específica. O único fator associado com metástase linfonodal foi o grau de diferenciação tumoral sendo que pacientes com tumores de alto grau e grau intermediário tiveram 2,51 vezes mais metástases linfonodais em comparação com os portadores de tumores de baixo grau. A invasão perineural foi determinante para a sobrevida global e câncer específica tanto na análise uni quanto multivariada com risco relativo de 6,412 (IC 95% [1,785-23,035]) e 7,155 (IC 95% [1,824-28,071]), respectivamente. As taxas de SG em 5 e 10 anos foram de, respectivamente, 63,6% e 42,0% e a SCE foi de 79,6% e 73,8%. **Conclusão:** A Ciclina D1 relacionou-se apenas com o grau histológico no fronte de invasão tumoral e não se mostrou como um fator prognóstico independente para o câncer de pênis no tocante a sobrevida e metástases linfonodais.

SUMMARY

Bosco AAD. **[Cyclin D1 immunohistochemistry expression and it's prognostic value in penile cancer]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Surgery for the primary tumor and regional lymphadenectomy are the corner stones for the penile cancer treatment. However, the late generates great morbidity. There aren't accurate methods for clinical lymph nodes staging and clinical and pathological characteristics are used to stablish those with higher risk of metastasis. Molecular biomarkers try to help stratifying those who will benefit from lymphadenectomy. However, Cyclin D1 has not been studied rightly on penile cancer. **Objectives:** State Cyclin D1 expression in penile cancer in different regions: tumor core, invasion front, peritumoral in situ carcinoma, and non-neoplastic tissue. Correlate the Cyclin D1 expression with lymph node metastasis, global survival (GS), and cancer specific survival (CSS). Compare these expressions with newborn intact tissue. **Material and Methods:** We retrospectively analysed 143 penile cancer patients and their demographic, clinical and pathological characteristics. We analysed 10 newborn prepuces as well from kids that were submitted to circumcision. An experienced pathologist reviewed the tumor paraffin blocs selecting the interest area (tumor, invasion front, and non-neoplastic tissue) and proceeded new slices. It was utilized streptavidin-biotin peroxidase technique. The positive result for Cyclin D1 was considered when there was more than 10% of reaction (independently of the type of reaction: weak, intermediate or strong). **Results:** Cyclin D1 expression was similar in the different regions. The reaction in the newborn was stronger than the rest. The only association found with Cyclin D1 and the clinical or pathological factors was the higher grade of the tumor at the invasion front at univariate analysis ($p=0,026$). Association with lymph node metastasis or survival were not seen. The tumor grade was the only factor associated with lymph node

metastasis and it was 2,51 times more common with intermediate and high grades. Perineural invasion was crucial for global and cancer specific survival (in the uni and multivariate analysis). The relative risk was 6,412 (CI 95% [1,785-23,035]) and 7,155 (CI 95% [1,824-28,071]), for global and cancer specific survival, respectively. GS for 5 and 10 years were 63,6% and 42,0% and CSS were 79,6% and 73,8%, respectively. **Conclusion:** Cyclin D1 correlated with histologic grade at the invasion front and it wasn't a good independent prognostic factor for penile cancer survival or lymph node metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Transição epitélio-mesênquima: modificação do fenótipo epitelial para o mesenquimal.....	18
Figura 2	Diagrama de fita do complexo Ciclina D1/CDK4.....	22
Figura 3	Papel esquemático do papel da Ciclina D1 no ciclo celular.....	24
Figura 4	Ciclo celular: regulação da transição G1/S.....	25
Figura 5	Distribuição por idade dos 143 pacientes com CaPe.....	33
Figura 6	Exemplo de demarcação da área de interesse com auxílio do software que determina a positividade nuclear para Ciclina D1 após digitalização da imagem.....	42
Figura 7	Representação da reação de imunoistoquímica com expressão nuclear da Ciclina D1 no PNN (castanho).....	46
Figura 8	Representação da reação de imunoistoquímica com: A) baixa expressão (1+) e B) alta expressão (3+) de Ciclina D1 no CdT.....	47
Figura 9	Representação do FIT com alta expressão (3+) da Ciclina D1..	48
Figura 10	Representação da expressão da Ciclina D1 no prepúcio de RN demonstrando forte reação (3+) em: A) menor aumento; e B) maior aumento.....	50
Figura 11	Positividade para a Ciclina D1 conforme as regiões.....	51

Figura 12	Curva de sobrevida global para os 143 pacientes portadores de CaPe, não estratificado por nenhuma das variáveis estudadas.....	59
Figura 13	Curva de sobrevida câncer específica para os 143 pacientes portadores de CaPe, não estratificado por nenhuma das variáveis estudadas.....	63
Figura 14	Sobrevida relacionada ao acometimento linfonodal.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência das variáveis demográficas e clínicas dos 143 pacientes portadores de CaPe.....	34
Tabela 2	Frequência dos aspectos cirúrgicos e patológicos dos 143 pacientes portadores de CaPe.....	35
Tabela 3	Subtipos histológicos da amostra de CaPe.....	36
Tabela 4	Tipo de linfadenectomia realizada.....	37
Tabela 5	Lateralidade do esvaziamento linfonodal realizado.....	37
Tabela 6	Complicações pós-operatórias das linfadenectomias realizadas	37
Tabela 7	Categorização dos grupos para análise no estudo	43
Tabela 8	Comparação entre a variação da expressão da Ciclina D1 no PNN, CdT, FIT, CIS e no RN, conforme a intensidade da reação.....	51
Tabela 9	Associação entre o grau histológico tumoral e a expressão da Ciclina D1 no FIT.....	53
Tabela 10	Associação entre os parâmetros patológicos e a expressão da Ciclina D1 no: CdT, FIT e CIS.....	54
Tabela 11	Associação da expressão da Ciclina D1 no CdT.....	55
Tabela 12	Associação da expressão da Ciclina D1 no FIT.....	55

Tabela 13	Associação da expressão da Ciclina D1 no CIS.....	56
Tabela 14	Associação entre a permeação linfonodal e variáveis demográficas, clínicas e patológicas.....	57
Tabela 15	Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida global.....	58
Tabela 16	Resultado da análise multivariada para sobrevida global.....	58
Tabela 17	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 143 pacientes portadores de CaPe.....	60
Tabela 18	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis patológicas em 143 pacientes portadores de CaPe	61
Tabela 19	Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida global.....	62
Tabela 20	Modelo multivariado para a sobrevida global em pacientes portadores de carcinoma peniano em 143 pacientes.....	62
Tabela 21	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 143 pacientes portadores de CaPe.....	64
Tabela 22	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 143 pacientes portadores de CaPe.....	65

Tabela 23	Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada de sobrevida câncer específica.....	66
Tabela 24	Modelo multivariado para a sobrevida câncer específica em pacientes portadores de carcinoma peniano em 143 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	do inglês "american association of pediatrics" (associação americana de pediatria)
CaPe	câncer de pênis
CCND1	ciclina D1
CDK	cinase dependente de ciclina
CdT	centro do tumor
CEC	carcinoma espinocelular, carcinoma epidermóide
CEP	comitê de ética em pesquisa
CKI	inibidor da cinase dependente de ciclina
CIS	carcinoma <i>in situ</i>
CPA	complexo promotor da anáfase
DNA	ácido desoxirribonucléico
DST	doença sexualmente transmissível
Ecad	E-caderina
FISH	do inglês "fluorescent in situ hybridization" (hibridização fluorescente <i>in situ</i>)
FIT	fronte de invasão tumoral
GSK3b	cinase gliconênio sintase 3b
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IC	intervalo de confiança
IDH	índice de desenvolvimento humano
IHC	imunoistoquímica
IPN	invasão perineural
IV	invasão vascular
OMS	organização mundial da saúde
OR	do inglês "odds ratio"(índice de probabilidades")
PNN	prepúcio não neoplásico com hiperplasia
RN	recém nascido
SPSS	statistical package for social science

SCE	sobrevida câncer-específica
SG	sobrevida global
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TEM	transição epitélio-mesênquima
TMA	do inglês "tissue microarray" (microarranjo tecidual)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Pênis	1
1.2	Postectomia.....	14
1.3	Fronte de Invasão Tumoral.....	17
1.4	Ciclo Celular	21
1.5	Regulação do Ciclo Celular e Ciclina D1	21
1.6	Considerações Finais	27
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Casuística.....	29
3.1.1	CrITÉRIOS de inclusÃO	30
3.1.2	CrITÉRIOS de exclusÃO	31
3.1.3	Exame anatomopatológico	31
3.1.4	Caracterização da amostra.....	33
3.2	Reação de imunoistoquímica	38
3.3	Interpretação das reações de imunoistoquímica	41
3.4	Análise estatística.....	43
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Expressão da Ciclina D1	45
4.1.1	Expressão da Ciclina D1 no prepúcio não-neoplásico hiperplásico (PNN).....	45
4.1.2	Expressão da Ciclina D1 no centro do tumor (CdT)	46
4.1.3	Expressão da Ciclina D1 no frente de invasão tumoral (FIT)	48
4.1.4	Expressão da Ciclina D1 no carcinoma <i>in situ</i> (CIS)	48
4.1.5	Expressão da Ciclina D1 no prepúcio de recém-nascidos (RN).....	49
4.1.6	Comparação da expressão da Ciclina D1 no PNN, CdT, FIT, CIS e RN	51

4.2	Associação entre a expressão de Ciclina D1 e os parâmetros clínico-patológicos	52
4.2.1	Associação entre a expressão de Ciclina D1 com metástase linfonodal	55
4.3	Avaliação de risco de metástase linfonodal	56
4.4	Análise de sobrevida	59
4.4.1	Sobrevida global	59
4.4.2	Sobrevida câncer específica	63
4.4.3	Sobrevida relacionada à metástase linfonodal	67
5	DISCUSSÃO	68
5.1	Aspectos gerais	68
5.2	Metodologia	70
5.3	Ciclina D1 e Fronte de Invasão Tumoral	75
5.4	Avaliação do risco de metástase linfonodal	80
5.5	Análise da sobrevida	81
5.5.1	Sobrevida global	81
5.5.2	Sobrevida câncer específica	81
6	CONCLUSÕES	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ANEXOS

Anexo 1 Classificação da retractibilidade do prepúcio

Anexo 2 Sistema de classificação do tumor de pênis - TNM, AJCC, 2010

Anexo 3 Estádios separados conforme a Classificação da AJCC

Anexo 4 Estadiamento do CaPe pelo *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER)

Anexo 5 Ficha de Levantamento de Dados em Câncer de Pênis

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE PÊNIS

O carcinoma de pênis (CaPe) é uma doença rara em nações desenvolvidas, e corresponde de 0,4% a 0,6% de todas as neoplasias malignas (GLOECKLER RIES et al. 2003). Na Europa, tem incidência de 0,1 a 0,9 casos por 100.000 homens assim como nos Estados Unidos, com taxas entre 0,7 e 0,9 por 100.000 homens (SOLSONA et al. 2004). A Sociedade Americana de Câncer estimou, em 2010, aproximadamente 1.300 novos casos para o ano seguinte, com 300 mortes relacionadas a este tumor. Nos países em desenvolvimento é um problema importante de saúde pública. Em algumas regiões da África, Ásia e América do Sul chega a corresponder a até 20% das neoplasias malignas no homem (RAJU et al. 1985). A maior incidência dessa neoplasia é na Índia (3,32/100.000 habitantes) e os menores índices encontram-se entre os judeus nascidos em Israel e nos Estados Unidos (0/100.000 e 0,07/100.000, respectivamente).

No Brasil, a incidência desta neoplasia é de 2,9 a 6,8/100.000 habitantes, o que coloca o país entre as maiores incidências mundiais da doença. Tem uma prevalência de 2% de todas as neoplasias no homem brasileiro (BRUMINI 1982). Aqui, ainda há uma grande disparidade entre as classes socio-econômico-culturais com relação às suas regiões. E essa diferença pode ser notada também na incidência de CaPe nas diversas

regiões do país. A maior parte dos tumores foram diagnosticados nas regiões Norte e Nordeste (53,02%) e Sudeste (45,54%) (FAVORITO et al. 2008). A transferência de renda para essas regiões na última década tende a diminuir esta diferença ao longo do tempo.

O aumento da incidência ocorre a partir da sexta década de vida, sendo infrequente em adultos abaixo de 30 anos e raramente descrito em crianças (NARASIMHARAO et al. 1985). Apesar do câncer de pênis estar mais associado com o aumento da idade, estudo publicado com dados brasileiros (283 novos casos) evidenciou tumor em 21,04% dos pacientes menores de 35 anos, 12% daqueles entre 36 e 45 anos, 18,7% dos pacientes entre 46 e 55 anos. Ressalta-se ainda neste estudo que foram verificados 10 casos em menores de 26 anos (FAVORITO et al. 2008). E este acometimento de pacientes jovens, acaba interferindo tanto no seu potencial procriativo quanto na autoestima com interferência direta na sua capacidade de trabalho.

Os fatores para o desenvolvimento do CaPe são a presença de fimose, as más condições de higiene, o baixo padrão socioeconômico, os efeitos crônicos e irritativos da pele, o número de parceiras sexuais, o histórico de doenças venéreas, infecção pelo papilomavírus humano (HPV), o uso de tabaco, radiação ultravioleta, líquen crônico e balanite xerótica obliterante (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; BRINTON et al. 1991; DALING et al. 2005; BLEEKER et al. 2009). Um estudo chinês tentou demonstrar os fatores de risco daquela população e viram que os fatores mais importantes estavam ligados à mobilidade do prepúcio: fimose e

parafimose. Além disso, condições de higiene ruins, principalmente a presença de esmegma, também foi relacionado. Relações sexuais fora do casamento, estavam associadas a um risco relativo de 1,7 e pareceu ter mais influência do que o número de parceiras na vida. Aqueles que tiveram doenças sexualmente transmissíveis (DST) mostraram maior associação com CaPe (BRINTON et al. 1991).

Tema recente de discussão na literatura médica, a prática de sexo com animais (zoofilia) demonstrou ser fator de risco para CaPe em análises uni e multivariadas. No entanto, não houve influência nas variáveis clínico-patológicas dos casos de CaPe (ZEQUI et al. 2011).

A fimose pode ser definida como sendo uma constrição patológica do prepúcio com dificuldade na exposição da glândula (GAIRDNER 1949; CALMON et al. 2011) e é citada como o principal fator de risco para o CaPe. O estado do prepúcio pode ser classificado em 5 tipos, baseados da sua retractibilidade (KAYABA et al. 1996) (Anexo 1).

Líquen esclero atrófico esteve presente em 10% das crianças com fimose e o seu tratamento com a postectomia não demonstrou progressão da doença após 5 anos (MEULI et al. 1994). O papel da postectomia, como forma de prevenção do CaPe já foi estudado. Observaram que homens que não foram circuncidados na infância, têm um risco maior de carcinoma invasivo e fimose comparando-se com homens circuncidados (DALING et al. 2005; PIZZOCARO et al. 2010).

Por outro lado, MADSEN et al. (2008) observaram que não havia diferença entre o risco de CaPe em homens circuncidados na infância com

relação àqueles não circuncidados. Aparentemente, o risco aumentado de CaPe nos primeiros se deve ao aumento da chance de desenvolver fimose. Em homens não circuncidados, a fimose pode causar lesões que facilitam o acesso do HPV ao epitélio basal, entre outras infecções (TOBIAN et al. 2012). Além disso, a fimose pode causar inflamação da glândula ou prepúcio que irá gerar infecção crônica que aumenta o risco de CaPe mesmo expondo o paciente a poucas parceiras sexuais (DALING et al. 2005). Mais além, a circuncisão pode proteger contra doenças associadas ao HPV por aumentar a taxa de resolução da infecção (HERNANDEZ et al. 2010; TOBIAN et al. 2012).

A infecção pelo vírus do HPV tem sido implicado na gênese do carcinoma peniano, tanto em estudos clínicos (BRINTON et al. 1991), quanto em estudos experimentais utilizando o genoma viral e o DNA da célula peniana (ROSEMBERG et al. 1991). A infecção é transmitida na maior parte das vezes durante o contato sexual, sem o uso do preservativo, por acesso direto das partículas virais às células basais através de pequenos traumas ou soluções de continuidade (BROKER 1987). Apesar do vírus apresentar mais de 100 subtipos, o HPV 16 é identificado em aproximadamente 80-90% das neoplasias malignas do pênis positivas para a infecção, enquanto o HPV 18 é encontrado em cerca de 10% dos casos (CUPP et al. 1995). No Brasil, uma análise com 82 pacientes relatou a presença do DNA-HPV em 30,5% dos casos, sendo 52% do tipo 16 e 16% do tipo 18 (BEZERRA et al. 2001). Apesar de se identificar uma taxa considerável de infecção pelo HPV no câncer peniano, variando de 31-63%

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

A incidência de DNA do HPV foi encontrado em 15 a 78% dos pacientes com CaPe. Essa variação tão grande deve-se à população estudada, método para coleta do material e ao método laboratorial para a identificação do vírus (PASCUAL et al. 2007).

Um modelo de carcinogênese peniana descrevendo as alterações moleculares que se acumulam durante a patogênese do carcinoma de pênis tem sido proposto. Neste conceito molecular, a etiologia é reconhecida como de natureza heterogênea com evidências apontando para ao menos duas rotas independentes de carcinogênese: induzida ou não por vírus (WATTLEWORTH 2011; HEIDEMAN et al. 2012).

As neoplasias malignas do pênis são divididas em primária ou secundária (esta, quando metastática). Subcategorias do tumor primário incluem tumores de tecidos moles, uretral e epitelial e outros tipos mais raros como melanoma, linfoma e schwannoma. Os tumores epiteliais podem então ser divididos em *in situ* ou invasivos (WATTLEWORTH 2011). O primeiro,

pode corresponder a eritroplasia de Queyrat, Doença de Bowen, papulose bowenóide e doença extra mamária de Paget. Os três primeiros, são quase que inequivocamente associados com o HPV e podem progredir para carcinoma invasivo se não tratados. Estas doenças têm aspectos histológicos e comportamento biológico semelhantes (a exceção é a Papulose Bowenóide que embora fenotipicamente indierenciável à microscopia, tem comportamento invariavelmente benigno) e dessa forma, são frequentemente consideradas como diferentes aspectos da mesma desordem pré-neoplásica (PORTER et al. 2002). No entanto, HOLLY e PALEFSKY (1993) notaram que o CIS e o câncer invasivo do pênis podem não representar estágios diferentes da mesma doença e que o CIS pode representar múltiplas condições com diferentes potenciais para a progressão do câncer invasivo.

Embora o carcinoma espinocelular (CEC) de pênis possa ser histologicamente semelhante existe um amplo espectro de subtipos diferentes tanto clínico, patológico, e talvez, etiologicamente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Instituto de Patologia das Forças Armadas ("Armed Forces Institute of Pathology") norte-americana reconhece os subtipos histológicos: usual, basalóide, verrucoso, "warty" (condilomatoso), papilífero, sarcomatóide, adenoescamoso e misto (GUIMARÃES et al. 2009). O subtipo histológico mais comum, encontrado em aproximadamente 65% dos casos, é o usual.

Há demora por parte dos pacientes em procurarem ajuda médica. Isso se deve, principalmente, por falta de acesso à saúde (como nas cidades

de regiões mais pobres) e, possivelmente, por vergonha e medo. Uma vez que esta doença raramente causa dor e não causa dificuldade miccional no início do quadro, o paciente protela a procura pelo médico que acaba fazendo o diagnóstico em estágios mais avançados da doença. A demora pode ir de 6 a 24 meses e prejudica não só o tratamento quanto o prognóstico da doença (BUDDINGTON et al. 1963; LOPES et al. 1994).

As lesões penianas são mais encontradas na glândula (48%), prepúcio (21%), em ambas as áreas em 9% e no sulco coronal em 6% dos casos (SUFRING e HUBEN 1987) e a apresentação clínica do CaPe varia de um edema súbito, uma pequena pápula, pústula ou verruga em crescimento a um extenso tumor com descamação abundante (CALMON et al. 2011). Os sintomas iniciais incluem prurido ou sensação de queimação abaixo do prepúcio, na glândula ou ulceração no prepúcio. E o diagnóstico é realizado através de biópsia da lesão peniana suspeita. Deve-se realizar a biópsia evitando-se as áreas centrais do tumor (região com necrose) tentando-se incluir uma região de transição com o tecido normal.

Uma vez feito o diagnóstico de CaPe, deve-se proceder com o estadiamento. Este, descreve a extensão ou severidade de uma neoplasia individualmente, baseado na extensão do tumor original (primário) e o seu alastramento no corpo. Para o CaPe, o estadiamento se baseia: 1- Tamanho do tumor primário; 2- Comprometimento linfonodal; 3- Presença ou ausência de metástase; 4- Grau de diferenciação do tumor primário.

O *American Joint Committee on Cancer* (AJCR) estabelece os critérios para avaliação do CaPe conforme descrito no Anexo 2 (SOBIN e

WITTEKIND 2004; EDGE et al. 2010). As últimas mudanças para o CaPe foram implementadas em 2010, com a publicação da sétima edição, quando subdividiram os tumores T1 em T1a e T1b. A diferença estabelecida foi com relação à presença ou ausência de invasão linfovascular ou com o grau de diferenciação tumoral, as quais quando presentes ou de alto grau, devem ser classificadas como T1b. Além disso, a categoria T3 ficou limitada à invasão uretral; a invasão prostática é considerada como T4. O estadiamento linfonodal foi dividido em categoria clínica e patológica e a distinção entre linfonodos inguinais superficiais e profundos foi abolida. Além disso, os carcinomas primários de uretra e os melanomas não foram incluídos (EDGE et al. 2010).

O padrão-ouro no tratamento do câncer de pênis é a ressecção cirúrgica da lesão peniana primária com margem de segurança, seguida de linfadenectomia inguinal e/ou ínguino-ilíaca radical clássica, quando indicada (CATALONA 1980; HORENBLAS et al. 1991; MOHS et al. 1992; LOPES et al. 1996).

O tratamento cirúrgico do CaPe primário muitas vezes é mutilante e causa prejuízo psicológico nos pacientes e na sua qualidade de vida, independentemente do nível sociocultural do paciente. Um estudo realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco, concluiu que as principais consequências verbalizadas pelos homens, algumas de natureza emocional, foram insônia, ideia de suicídio, medo e tristeza intensa (BARROS e MELO 2009).

Nos dias de hoje, a maior parte dos tratamentos cirúrgicos para controle do tumor primário é a penectomia parcial (KROON et al. 2005a; GUIMARÃES et al. 2009) e diversas técnicas de reconstrução já foram propostas, sempre com o intuito de melhorar tanto cosmiética quanto funcional (DA FONSECA et al. 2003; KORKES et al. 2010). Com o desenvolvimento tecnológico, técnicas cada vez menos invasivas estão sendo utilizadas, principalmente nos casos de lesões pequenas e em estágios iniciais, como a radioterapia (braquiterapia), glandectomias parciais, associadas a enxertos cutâneos e laser terapia (MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007; PETERA et al. 2011), entre outros.

A linfadenectomia inguinal ou inguino-ilíaca bilateral tem papel relevante no tratamento dos pacientes com CaPe. O CEC de pênis tem drenagem linfática preferencialmente para a região inguinal antes da ocorrência de metástase à distância. Embora alguns textos sobre anatomia advogarem que os linfáticos penianos possam drenar diretamente aos linfonodos ilíacos externos, não há até o momento, nenhum relato na literatura que isso ocorra clinicamente (PETTAWAY et al. 2007). Apesar da metástase linfonodal da cadeia inguinal conferir um pior prognóstico, a linfadenectomia agressiva está associada a uma maior sobrevida a longo tempo e tem um potencial de cura em 30 a 60% dos pacientes (MCDOUGAL et al. 1986; HORENBLAS et al. 1993). Quando há metástase para os linfonodos pélvicos, a sobrevida a longo tempo é menor do que 10%.

No entanto, a linfadenectomia inguinal está associada a altas taxas de morbidade. Protocolos foram estabelecidos com o intuito de diminuir as

intervenções cirúrgicas desnecessárias. Após o tratamento da doença primária, alguns advogam o uso de antibióticos por 2-6 semanas com o intuito de diminuir o volume dos linfonodos inguinais que estão, muitas vezes, aumentados apenas devido a infecção peniana.

CABAÑAS em 1977, já havia proposto um método para selecionar pacientes para serem submetidos a linfadenectomia através da identificação de linfonodo sentinela. No entanto, com o passar dos anos, observou-se que muitos daqueles classificados como não portadores de metástase linfonodal, vieram a apresentar a doença. Outros métodos desenvolvidos com o intuito de melhorar a acurácia no diagnóstico clínico do comprometimento linfonodal. Ainda com o intuito de detecção de linfonodos que clinicamente eram negativos, usou-se a linfocintilografia pré-operatória com sensibilidade de aproximadamente 80%. No entanto, ainda assim, observou-se níveis de falso-negativos de 22% dos casos (TANIS et al. 2002). Recentemente, com o vencimento da curva de aprendizado os falso negativos se reduziram para 4% neste grupo, mas não são reproduzidos em demais instituições (KROON et al. 2005b).

Os exames de imagem tinham pouca validade até a última década. No entanto, surgiram novas técnicas que aumentaram a sensibilidade dos métodos na tentativa de identificar lesões linfonodais. GRAAFLAND et al. (2011) demonstraram que a presença de necrose central do linfonodo e/ou irregularidade das suas bordas nas imagens das tomografias computadorizadas (TC) pré-operatórias foram os critérios radiológicos mais úteis para se identificar os pacientes com alto risco de comprometimento por

câncer de pênis. Houve uma associação com prognóstico linfonodal desfavorável com uma sensibilidade de 95%, especificidade de 82% e acurácia de 87%. Houve concordância inter observador demonstrando que estes achados são reprodutíveis e, portanto, podem atuar como outra ferramenta na estratificação do risco desta doença.

TABATABAEI et al. (2005) demonstraram o uso da ressonância magnética (RNM) com nanopartículas em um estudo com 7 pacientes com CaPe com sensibilidade de 100% e especificidade de 97% e valor preditivo positivo de 81,2% para se detectar doença micrometastática.

Existe hoje uma tendência de se realizar a linfadenectomia profilática e não terapêutica. Isso porque observou-se sobrevida maior na primeira em comparação com a segunda (MCDOUGAL et al. 1986; FRALEY et al. 1989). As técnicas para a realização da linfadenectomia têm sofrido modificações nos últimos anos. A linfadenectomia inguinal foi modificada por CATALONA em 1988, o que diminuiu a incisão da pele, limitou a borda lateral à artéria femoral e caudalmente à fossa oval com preservação da veia safena e eliminação da necessidade de transposição do músculo Sertório.

Mais recentemente, outras técnicas foram desenvolvidas utilizando-se a vídeo cirurgia, com menores taxas de morbidade nos estudos iniciais (TOBIAS-MACHADO et al. 2006, 2007). E no último ano, o aprimoramento da técnica permitiu que a cirurgia fosse realizada através de um portal único (TOBIAS-MACHADO et al. 2011).

Há muito tempo é reconhecido que os fatores histopatológicos têm influência no prognóstico dos pacientes com CaPe. Estudo recente avaliou o

prognóstico do CaPe após o tratamento cirúrgico da doença primária utilizando tanto o sistema TNM (Anexo 2) quanto os estadios conforme a AJCC (Anexo 3) associados com o grau de diferenciação tumoral e compararam com o estadiamento utilizado pelo *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), encontrado no Anexo 4. Puderam observar que o estadiamento pela AJCC associado ao grau de diferenciação tumoral tem boa acurácia na predição da mortalidade câncer específica (THURET et al. 2011).

Após a modificação dos critérios de acometimento linfonodal do sistema TNM na sétima edição, ZHU et al. (2011) compararam a sobrevida daqueles que foram submetidos a linfadenectomia e apresentavam linfonodos comprometidos. Observou-se que a nova classificação tem melhor correlação com a sobrevida e adicionando-se a lateralidade da metástase ou a taxa de positividade dos linfonodos aumentaram ainda mais a sua acurácia (ZHU et al. 2011).

GUIMARÃES et al. (2006) estudaram o padrão de infiltração tumoral demonstrando diferença entre tumores infiltrativos (com invasão em blocos tumorais sólidos que infiltravam amplamente o estroma do órgão) e tumores "pushing" (invasão de células tumorais que mantêm a interface com as células não tumorais bem delimitada). Concluíram que a diferença entre os padrões de invasão era um fator prognóstico independente, mesmo após análise multivariada.

FICARRA et. al. realizaram um nomograma prognóstico com variáveis patológicas como a espessura tumoral, padrão de crescimento microscópico,

graduação, presença de invasão linfovascular, comprometimento do corpo cavernoso, esponjoso ou uretra e estadiamento clínico dos linfonodos. O fator preditor mais importante para sobrevida livre de doença nestes pacientes foi a incidência e extensão do comprometimento linfonodal.

Após anos de estudo das variáveis anatômicas e anatomopatológicas com identificação de diversos aspectos histológicos ainda encontram-se lacunas nas avaliações do comportamento biológico das neoplasias penianas. O desenvolvimento da biologia molecular tenta suprir esta carência. Técnicas e reagentes específicos foram desenvolvidos nas últimas décadas e houve um importante avanço na compreensão de alguns tumores, dentre eles, o de pênis.

Vários estudos já foram publicados, inclusive nesta instituição, com o principal intuito de correlacionar os dados encontrados nos laboratórios com os clínicos. Com relação específica ao CaPe, muito tem sido discutido a respeito dos marcadores biomoleculares e sua relação com o prognóstico da doença e como o envolvimento linfonodal, por ter muita relevância, também tem sido estudado (LOPES et al. 1996; GUIMARÃES 2003; CAMPOS 2003; SOUZA NETO 2008; ANDRADE 2009; GUIMARÃES 2010; SILVA 2010; GUIDONI 2010; SOUZA 2011; FREITAS-RODRIGUES 2011).

1.2 POSTECTOMIA

A circuncisão é um dos procedimentos cirúrgicos mais antigos realizados até hoje, com relatos com 6.000 anos no Egito antigo (RIZVI et al. 1999). Inicialmente, era realizada por motivos religiosos, tanto por parte dos judeus quanto para muçulmanos. Os primeiros realizam este procedimento devido a um pacto entre Deus e Abraão e seus descendentes de acordo com o Torá (os cinco livros de Moisés) sendo que a primeira referência à circuncisão aparece no livro Gênesis (17:10-14):

"Esta é a minha aliança, que guardareis entre mim e vós, e a tua descendência depois de ti: Que todo o homem entre vós será circuncidado. E circuncidareis a carne do vosso prepúcio; e isto será por sinal da aliança entre mim e vós. O filho de oito dias, pois, será circuncidado, todo o homem nas vossas gerações; o nascido na casa, e o comprado por dinheiro a qualquer estrangeiro, que não for da tua descendência. Com efeito será minha aliança na vossa carne por aliança perpétua. E o homem incircunciso, cuja carne do prepúcio não estiver circuncidada, aquela alma será extirpada do seu povo; quebrou a minha aliança"(GLASS 1999).

Já para os muçulmanos, há diferentes opiniões entre as seis escolas existentes sobre a circuncisão. No entanto, somente a escola Shafiita que considera a circuncisão obrigatória e as outras interpretam este procedimento como "sunnah" (tradição do profeta), sendo uma recomendação. O fato de não se realizar a circuncisão não interfere na religiosidade islâmica (RIZVI et al. 1999).

A partir do século 19, com melhora da anestesia e das técnicas cirúrgicas e de antissepsia, a postectomia se tornou um procedimento médico comum. É o quinto procedimento cirúrgico mais realizado nos Estados Unidos da América sendo que em 1992, foram realizadas aproximadamente 1.2 milhões (incidindo 62% dos recém-nascidos do sexo masculino). Até meados da década de 70, quando a Associação Americana de Pediatria (AAP) definiu que não se tratava de um procedimento médico necessário, houve um aumento muito grande de procedimentos. Depois desta decisão, com o declínio do número, observaram que houve um aumento no risco de infecção urinária em lactentes do sexo masculino não-circuncidados. Hoje, não há nenhum tipo de recomendação para a postectomia rotineira.

O desenvolvimento do prepúcio se inicia na oitava semana de gestação e é completada na décima sexta semana, quando a mucosa do prepúcio e a glândula são contíguos. O processo de descamação ou exfoliação do epitélio interno separa as duas camadas, resultando na lise das aderências fisiológicas com a resolução da "fimose". Este processo acontece gradualmente e geralmente é completo até os 3 anos de idade, podendo perdurar até a idade da maturação sexual (HUTCHESON 2004).

Discute-se sobre as consequências da postectomia na atividade sexual. O prepúcio possui mucosa especializada recoberta por epitélio escamoso semelhante à mucosa da boca, vagina e esôfago. É rico em nervos com múltiplos corpúsculos de Meissner semelhante a os encontrados nas pontas dos dedos e nos lábios. Durante o intercurso sexual, o prepúcio

proporciona um mecanismo de deslizamento para o pênis durante a penetração e pode prevenir a perda da secreção vaginal.

A postectomia remove a barreira protetora da glândula peniana resultando em aumento da ceratinização da glândula. Há parada na produção do esmegma (que é o exsudato de células mortas da pele) e gorduras que podem ter efeito fero Mônico (HUTCHESON et al. 2004).

Tenta-se correlacionar a postectomia na infância com a diminuição do risco de CaPe, uma vez que é uma doença rara em pacientes circuncidados (BISSADA et al. 1986). A presença de fimose é um dos principais fatores de risco para CaPe e também uma das principais indicações para postectomia. Meta-análise neste tema foi realizada recentemente por LARKE et al. (2011) e observaram que a circuncisão foi um forte protetor para CaPe invasivo (OR = 0,33, IC 95% 0,13-0,83) em 3 estudos. Em outros dois trabalhos, quando foram excluídos os casos de postectomia por fimose, a circuncisão na infância ou adolescência não mostrou ter um efeito protetor. Diferentemente do verificado para o CaPe invasor, houve pouca evidência de associação da neoplasia intraepitelial peniana ou carcinoma *in situ* com a circuncisão em qualquer idade.

1.3 FRONTE DE INVASÃO TUMORAL

Sabemos que há diferença do comportamento tumoral no frente de invasão se compararmos com o restante do tumor. Essa transição ocorre no limite entre o tumor e tecido peritumoral onde há indução por citocinas, pelo ambiente da matriz extracelular ou pela hipóxia. Nas célula tumoral, há influência de fatores de transcrição e micro-RNAs no frente de invasão. KAHLERT et al. (2011) correlacionaram a hiperexpressão do gen ZEB2 no frente de invasão com a progressão tumoral e com a sobrevida câncer específica no câncer colorretal.

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é o processo biológico verificado nas áreas de FIT que permite que uma célula epitelial polarizada (que normalmente interage com a membrana basal através da sua superfície basal) passe por múltiplas mudanças que fazem com que assuma um fenótipo celular mesenquimal (Figura 1). Isto inclui o aumento na capacidade de migração, invasividade, resistência elevada a apoptose e grande aumento da produção de componentes da matriz extracelular. Complementando, a TEM é caracterizada pela degradação da membrana basal e pela formação de células mesenquimais que podem migrar da camada epitelial das quais foram originadas (KALLURI e WEINBERG 2009).

Estudo em câncer de próstata demonstrou haver expressão aberrante de E-caderina, Vimentina, PDGF-D, NF-kB, Notch-1 e ZEB1 e esta alteração variou de acordo com a localização no próprio tumor primário, sendo mais evidente no frente de invasão tumoral (FIT) do que no centro do tumor

(SETHI et al. 2010). Alterações morfológicas como a perda da polaridade celular e coesão intercelular também foram estudados no fronte de invasão no carcinoma papilífero da tireoide. Observaram que estas alterações morfológicas se mostraram importantes sinalizadores de metástase linfonodal correlacionando-se com a agressividade da doença (LIU et al. 2011).

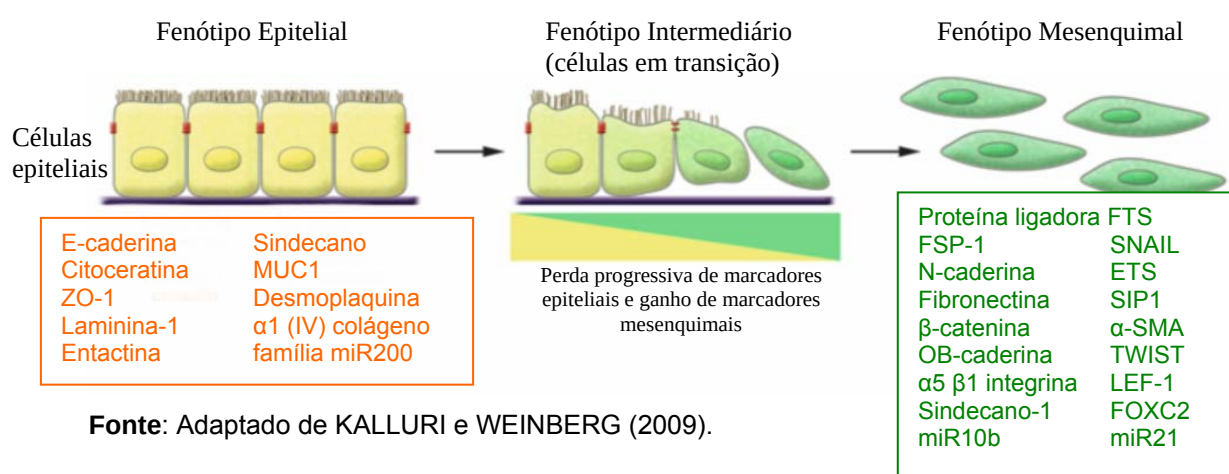


Figura 1 - Transição epitélio-mesênquima: modificação do fenótipo epitelial para o mesenquimal.

Nesta instituição, tem sido estudado o fronte de invasão tumoral em CaPe e a TEM. GUIMARÃES et al. (2006) utilizando critérios modificados de Anneroth e Bryne (que estudaram o carcinoma de cavidade oral), observaram que o padrão de infiltração do tumor primário (infiltrativo ou “infiltrating” vs. deslocador ou “pushing”) foi um fator prognóstico independente para metástase linfonodal, com os tumores infiltrativos tendo 4 vezes mais metástases linfonodais e maior agressividade do que os tumores que causavam deslocamento apenas.

Recente tese de doutorado estudou a expressão de E-caderina (Ecad) e vimentina no FIT e no centro do tumor (CdT). Observaram que a perda da expressão da Ecad é maior no FIT e está associada com os fatores clássicos de mau prognóstico como: os tumores poucos diferenciados, de padrão infiltrativo, metástase linfonodal, invasão perineural e invasão angiolinfática e piores sobrevida câncer específica e global. O fenótipo da TEM definido como a perda da expressão de Ecad e ganho de vimentina foi associado com todos os fatores de mau prognóstico, incluindo piores sobrevidas global e câncer específica (SOUZA 2011).

Temos demonstrado que o estudo do FIT e da TEM contribuiu muito para a compreensão da disseminação do CaPe nos últimos estudos. Acreditamos que o fato de termos estudado a expressão da Ciclina D1 pela técnica de TMA no passado impediu que pudéssemos acompanhar a expressão deste marcador no FIT e impediu que comparássemos as duas expressões, uma vez que os fragmentos de TMA são de pequenas dimensões (< 1,0 mm) e representam apenas o cerne do tumor. Para que analisemos adequadamente todas as nuances a partir da área com fenótipo epitelial puro, passando através das regiões de transição até as áreas de diferenciação mesenquimal e, além disso, para que possamos avaliar a transição de região tumoral com tecido normal, secções de lâminas tradicionais são mais adequadas, uma vez que representam grande porção dos espécimes cirúrgicos.

Até o momento, não existem trabalhos que demonstrem a expressão imunoistoquímica da Ciclina D1 em tecido peniano de pacientes sem

histórico de tumor. Acreditamos que a análise da expressão da Ciclina D1 nos diferentes tecidos, tanto neoplásico quanto não neoplásico, pode contribuir para a compreensão da oncogênese do CaPe.

O CaPe escamoso e suas derivações raramente acometem crianças. Entretanto, em adultos o CaPe se apresenta como uma das neoplasias malignas cuja gênese mais parece resultar agressões do meio externo. Más condições de higiene e saneamento, tabagismo, fimose e balanopostites, líquen, micro traumas, irritação esmegmática, afecções venéreas (infecção por HPV entre outros) e de hábitos sexuais promíscuos são sobejamente reconhecidos na sua etiopatogenia. Deste modo acreditamos que o prepúcio de recém-natos, que usualmente é descartado após a postectomia nos primeiros dias de vida, poderia ser um interessante controle negativo, uma vez que essas crianças são operadas nos primeiros dias de vida, sem praticamente qualquer ação do meio externo. A exceção é a improvável contaminação com fezes, ou efeito algum amoniacal pela presença da urina. Todavia, sabemos que essas crianças apresentam um “turnover” celular bastante aumentado.

1.4 CICLO CELULAR

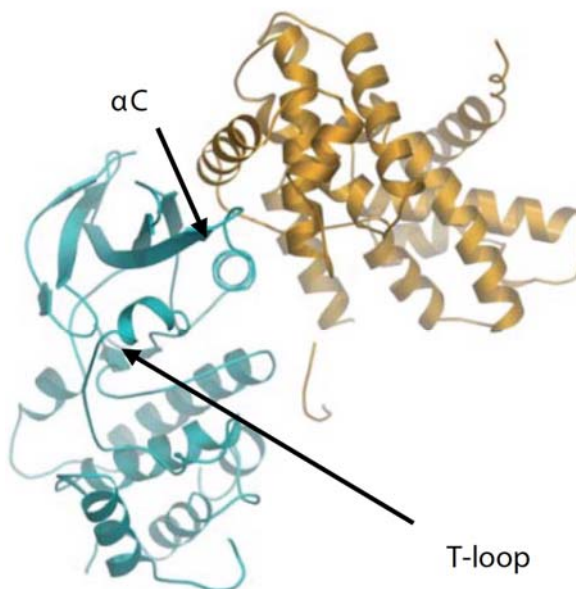
Desde o final do século XVIII o estudo do núcleo celular vem sendo realizado após a introdução da microscopia ótica nos laboratórios. Já naquela época chamava a atenção o processo de divisão celular, bem visível nas fases de mitose e citocinese.

O ciclo celular dos organismos eucarióticos é dividido em quatro estágios: G1, S, G2 e M. G1 é a fase na qual a célula se prepara para a replicação do DNA. É durante esta fase que a célula integra sinais mitogênicos e inibitórios do crescimento e toma a decisão de proceder, parar ou sair do ciclo celular. G1 é uma fase importante e neste ponto, há um "checkpoint" onde a célula se compromete com a replicar o DNA e completar o ciclo celular. A fase S é definida como um estágio no qual a síntese do DNA acontece. G2 é a segunda fase de hiato na qual a célula se prepara para o processo de divisão. M (mitose), é a fase que os cromossomos replicados são segregados em núcleos separados e ocorre a citocinese para formar a célula filha. Além disso, o termo G0 é usado para descrever as células que saíram do ciclo celular e se tornaram quiescentes (JOHNSON e WALKER 1999). Em contraste com o meio extracelular, a integridade de uma célula é examinada por diferentes "checkpoints" por todo o ciclo celular. Cada um destes processos testa o término da fase anterior e é definida como "controle do checkpoint". Como o DNA alterado pode ser propagado durante a replicação e mitose, o ciclo celular acontece o "sequestro" celular (principalmente na fase G1, antes da fase S) e na G2 (antes da mitose); mas

também pode ocorrer na fase S. O sequestro na fase G1 previne a replicação aberrante do DNA lesado e o sequestro em G2 faz com que a célula evite a segregação de cromossomos defeituosos (AGAMI e BERNARDS 2002).

1.5 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E CICLINA D1

A Ciclina D1 (CCND1) é um membro da família das ciclinas, subunidade regulatória das cinases dependentes de ciclina que controlam a passagem das células em proliferação pelo ciclo celular (HALL e PETERS 1996) que foi identificada inicialmente por dois grupos em 1991 (MATSUSHIME et al. 1991; XIONG et al. 1991) (Figura 2).



2334Å²

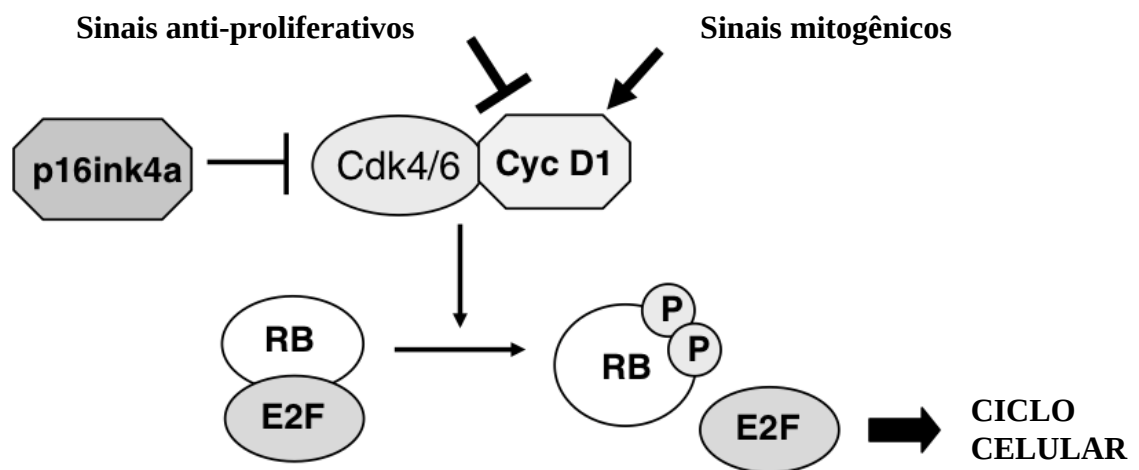
D1 (alaranjado)/CDK4(ciano). A hélice -αC é vista no final. Pode ser visto que a Ciclina D1 tem contato primariamente ao lobo-N e hélice-αC da CDK4.

Fonte: Adaptado de DAY et al. (2009)

Figura 2 - Diagrama de fita do complexo Ciclina.

A CCND1 está diminuída em células quiescentes e aumentada nas células logo antes da fase S do ciclo celular (controla a progressão da fase G1-S) (SCULLY et al. 2000). Ela se liga e ativa CDK4 e CDK6; este complexo catalisa a fosforilação da proteína Rb (do gen supressor tumoral do retinoblastoma) resultando na liberação dos reguladores transcricionais E2F promovendo a progressão do ciclo celular. Esta ação da CCND1 é antagonizada pela p16^{ink4a} que se liga à molécula de CDK e interrompe a associação com a Ciclina D1 (Figura 3) (KNUDSEN et al. 2006).

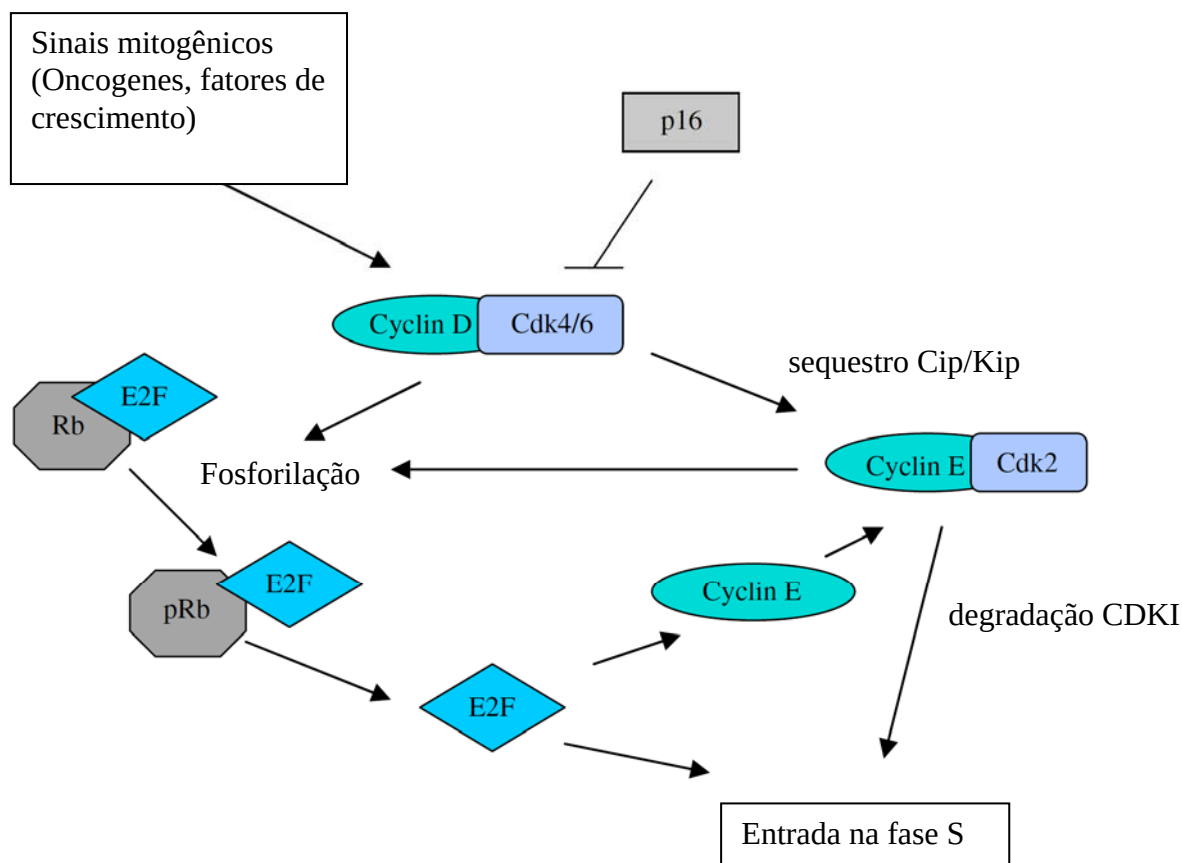
A desregulação da expressão da ciclina afeta o controle do crescimento celular normal que está ligado à oncogênese. O gen da CCND1 funciona como um oncogene e tem o papel na progressão tumoral *in vivo* (HINDS et al. 1994) e está localizado no cromossomo 11q13 (LUKAS et al. 1995). Quando a expressão da ciclina está desregulada, o controle do crescimento celular é perdido e isto leva a uma hiperexpressão da CCND1. Esta hiperexpressão tem sido demonstrada nos carcinomas de mama (BUCKLEY et al. 1993), ovário (CHEN et al. 2005), vulva (KNOPP et al. 2005), esôfago (JIANG et al. 1992), carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (MICHALIDES et al. 1995) e também na tireoide (LAZZERESCHI et al. 1998) e acredita-se que possa encurtar a fase G1, acelerando o crescimento celular, contribuindo desta forma com a oncogênese (RESNITZKY et al. 1994).



Fonte: Adaptado de KNUDSEN et al. (2006)

Figura 3 - Papel esquemático do papel da Ciclina D1 no ciclo celular.

Além dos sinais mitogênicos promoverem a união da CCND1 e CDK4/6, sequestram as proteínas Cip/Kip facilitando desta forma a ativação do complexo ciclina E-CDK2. A ciclina E juntamente com CDK2 ajuda a fosforilar a proteína Rb resultando na liberação do fator de transcrição E2F que irá ativar vários gens responsáveis para a progressão à fase S (Figura 4).



Fonte: Adaptado de ROY e THOMPSON (2006)

Figura 4 - Ciclo celular: regulação da transição G1/S.

CDK 4 facilita a ativação do complexo CDK 2/Ciclina E por sequestrar CKIs da família p21/p27. CDK 2/Ciclina E é necessária para o início da replicação do DNA. Durante a progressão normal do ciclo celular, o equilíbrio entre síntese e degradação proteica regulam o nível de Ciclina. A abundância da Ciclina D1 é controlada pela proteólise que envolve dois mecanismos distintos e independentes. Durante a progressão do ciclo celular a Ciclina D1 é fosforilada em treonina 286 seguindo ativação da via PI3K-Akt-GSK3b, assim sinalizando para a degradação no proteassoma. A inativação de GSK3b pode resultar no acúmulo de Ciclina D1 não-fosforilada.

Alternativamente, o Complexo Promotor da Anáfase (CPA) é responsável pela rápida degradação da Ciclina D1, não necessitando da fosforilação em treonina 286. A inativação de um ou mais componente da via Ciclina D1-Rb é observada na maioria dos tumores, sugerindo que a desregulação do mecanismo contribui para o descontrole da proliferação celular. O acúmulo da Ciclina D1 ocorre em várias neoplasias humanas, incluindo a mama, esôfago, fígado, pulmão e carcinoma da cabeça e pescoço (KIM et al. 2002).

A progressão do ciclo celular é dirigida pela atividade das CDKs em conjunto com suas parceiras, as ciclinas. CKIs são reguladores da atividade da ciclina/CDK. Existem duas famílias de CKIs: a família INK4 (que inibe a ciclina/CDK de G1) e a família Cip/Kip (que interage com uma gama maior de ciclinas/CDKs para controlar mais aspectos do ciclo celular). A família Cip/Kip das CKIs compreendem três proteínas: p21^{Cip1/WAF1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2} que se ligam e inibem os complexos Ciclina/CDK que são reguladores-chave da transcrição, apoptose e dinâmica do citoesqueleto. p21, p27 e p57 funcionam como supressores tumorais baseados na sua habilidade de inibir o complexo ciclina-CDKs no núcleo. O acúmulo citoplasmático delas (provavelmente resultantes de sua função insuficiente) têm sido demonstrado em muitos tumores e o acúmulo de p21 e p27 no citoplasma está ligado a agressividade tumoral, metástase e pior prognóstico (STAROSTINA e KIPREOS 2012).

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o presente momento, há dúvidas com relação à importância dos marcadores biomoleculares relacionados à proliferação celular no CaPe. De SOUZA NETO (2008) não conseguiu mostrar relação da expressão imunoistoquímica intratumoral da Ciclina D1 com a sobrevida em CaPe nem com a presença de metástase linfonodal, através da técnica de tissue microarray (TMA).

PAPADOPOULOS et al. (2007) estudaram tanto a Ciclina D1 quanto Ki-67 no CEC de pênis, líquen escleroso, condiloma acuminado e na eritroplasia de Queyrat. Com um corte de 10% para positividade para Ciclina D1 (somente utilizando as reações fortes ou intermediárias), encontraram uma associação marginal com a atividade proliferativa. Apesar de citar que houve associação da expressão da Ciclina D1 com um pior prognóstico, não foram apresentadas curvas de sobrevida, mesmo porque a amostra de CaPe foi pequena (21 casos).

2 OBJETIVOS

- Avaliar a expressão da ciclina D1 nos tumores de pênis através de imunoistoquímica (IHC) aplicada a cortes histológicos tradicionais correlacionando-a com metástase linfonodal, sobrevida câncer específica e sobrevida global, em comparação com diversas variáveis clinico-patológicas e demográficas.
- Comparar a expressão da Ciclina D1 no centro do tumor, no fronte de invasão tumoral, no carcinoma *in situ* peritumoral e no prepúcio não-neoplásico de pacientes com câncer de pênis e no prepúcio de recém-nascidos submetidos a postectomia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados casos com amostras de CaPe que compõem a blocoteca do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Apesar de haver mais de trezentos casos de CaPe no período selecionados, avaliamos 143 pacientes que foram submetidos ao tratamento cirúrgico do tumor primário entre Março/1954 e Outubro/2006 no Hospital do Câncer A.C. Camargo. Uma parte dos casos antigos foram excluídos uma vez que, devido à utilização do material em outros estudos, demonstravam escassez de material a ser reavaliado com novos cortes histológicos.

Foram analisadas também 10 amostras de prepúcios de recém-nascidos que foram submetidos a postectomia, através de expressa colaboração de nosso colega, Dr. Fernando Korkes, urologista do Hospital Israelita Albert Einstein, em São Paulo. Estes pacientes foram submetidos à cirurgia por motivos religiosos, médicos ou por desejo dos seus pais não havendo influência dos pesquisadores na escolha deste tratamento.

O projeto faz parte do Projeto Temático em Câncer de Pênis financiado pela FAPESP (no 2009/52088-3, vigência 01/10/2009 a 30/09/2014), intitulado: "O carcinoma de pênis: estudo de um problema brasileiro, abordando da morfologia aos mecanismos moleculares" sendo o

responsável o Dr José Vassallo na instituição Hospital do Câncer A.C. Camargo-Fundação Antônio Prudente de São Paulo. Participam ainda os seguintes pesquisadores: professores doutores Fernando Augusto Soares, Ademar Lopes e Sílvia Rogatto, além dos doutores Gustavo Cardoso Guimarães, Isabela Werneck da Cunha e Stênio de Cássio Zequi.

Houve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo (sob o número 1420/10), que foi aceito no Hospital Israelita Albert Einstein, onde foram realizadas as postectomias dos recém-nascidos. Todos os responsáveis legais pelas crianças submetidas à postectomia receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado previamente pelo CEP.

Os dados clínicos dos pacientes com CaPe foram obtidos a partir da análise de prontuário médico que compõem um banco de dados do Departamento de Cirurgia Pélvica, Núcleo de Urologia. Outros estudos já foram conduzidos pelo grupo e os principais dados foram utilizados em diversas dissertações de mestrado e teses de doutorado (SOUZA NETO 2008; GUIDONI 2010; SILVA 2010; GUIMARÃES 2010; FREITAS-RODRIGUES 2011; SOUZA 2011).

3.1.1 Critérios de inclusão

Os casos escolhidos para análise deveriam constar nos seguintes critérios:

- 1 Blocos de parafina que contivessem a extensão do tumor (incluindo toda a extensão vertical).

- 2 Blocos com material suficiente para realização de cortes tradicionais para reação de IHC;
- 3 Lâminas que contivessem o tumor e o fronte de invasão tumoral;
- 4 Prepúcio de pacientes recém-nascidos sem história de câncer que foram submetidos a postectomia por indicação médica e cujos espécimes foram totalmente examinados e não havia evidências de alterações histológicas no extrato epitelial e/ou inflamação em atividade e cujo mãe não apresentasse infecção por HPV genital.

3.1.2 Critérios de exclusão

- 1 Pacientes com metástase à distância ao diagnóstico;
- 2 Pacientes que foram submetidos ao tratamento do tumor primário mas que apresentaram óbito antes da alta hospitalar;
- 3 Pacientes que foram submetidos à postectomia cujo os representantes legais não aceitaram a inclusão do prepúcio no presente estudo.

3.1.3 Exame anatomopatológico

Tanto as lâminas dos pacientes com CaPe quanto dos recém-nascidos foram examinadas por um médico patologista experiente (F.A.S.) que delimitou as áreas de interesse: centro do tumor (CdT), fronte de invasão tumoral (FIT), presença de CIS peritumoral e prepúcio não neoplásico (PNN) com hiperplasia além de recém-nascidos (RN).

Para o estabelecimento do padrão de expressão da Ciclina D1 no prepúcio não-neoplásico, foram avaliadas amostras de casos de pacientes com CaPe, mas que não apresentavam alterações morfológicas características da doença em determinado corte histológico (tecido à distância do tumor, distando ao menos 1,0 cm da lesão a macroscópica). Todo o prepúcio, mesmo as áreas sem tumor, foi examinado e foi analisado quando apresentava hiperplasia ou CIS.

Os prepúcios dos RN's foram analisados na sua totalidade e excluiu-se a presença de tumores ou processo inflamatório significativo que pudessem influenciar na expressão do marcador em questão.

Os casos de CaPe foram analisados com relação aos aspectos anatomopatológicos. Foram classificados quanto:

- a) Grau de diferenciação do tumor de acordo com as categorias: bem, moderadamente e pouco diferenciado (VELAZQUEZ et al. 2008);
- b) Padrão de infiltração classificados, no fronte de invasão, como regular ou irregular (GUIMARÃES et al. 2006);
- c) Estadio T de acordo com o sistema TNM (EDGE et al. (2010): T1 a T4;
- d) Metástase linfonodal presente ou ausente (com invasão do tumor no tecido linfonodal maior que 2 mm) (HORENBLAS et al. 1993);
- e) Invasão perineural (IPN) definida como presente ou ausente (VELAZQUEZ et al. 2008);
- f) Invasão vascular venosa ou linfática (IV): em presente/ausente (LOPES et al. 1996).

3.1.4 Caracterização da amostra

A amostra consiste de 143 casos de CaPe submetidos ao tratamento cirúrgico do tumor primário com média de idade de $54,43 \pm 13,53$ anos, com mínimo de 24 e máximo de 85 anos (Figura 5).

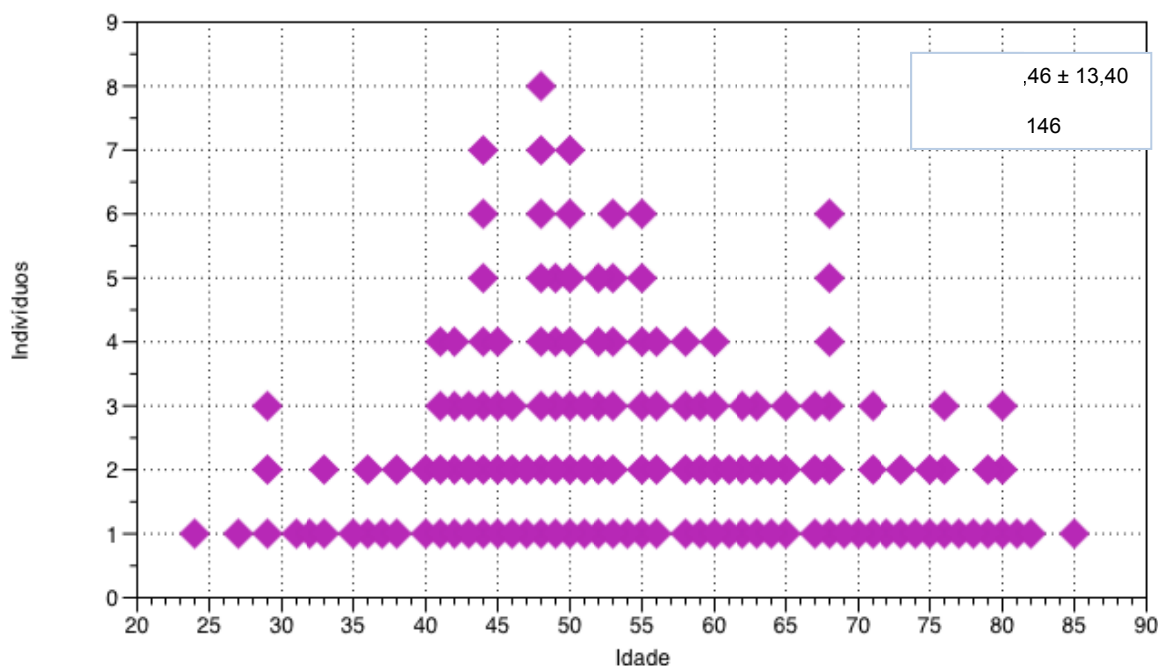


Figura 5 - Distribuição por idade dos 146 pacientes com CaPe.

O tempo médio para procurar auxílio médico após o aparecimento dos sintomas foi de $12,95 \pm 16,13$ meses (variando de 1 a 108 meses). A frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 143 pacientes com CaPe estão apresentadas abaixo (Tabela 1).

A amostra foi constituída por tumores invasivos de pênis, sendo que 87,4% deles foram classificados como tendo estadió patológico $> T1$. Os procedimentos cirúrgicos mais realizados foram a amputação parcial (51% dos casos) e a total (42,7% dos casos).

Quanto ao grau de diferenciação tumoral, houve uma distribuição relativamente equilibrada: bem diferenciados (27,5%), moderadamente diferenciados (35,2%) e pouco diferenciados (37,3%). Com relação à invasividade do tumor no pênis, observamos maior acometimento de corpo esponjoso (95,3%) em comparação ao corpo cavernoso (63%). Invasão vascular foi vista em 21,6% enquanto a invasão perineural foi de 14,2%.

Tabela 1 - Frequência das variáveis demográficas e clínicas dos 143 pacientes portadores de CaPe.

Variável	Categoria	Número de pacientes	%
Idade	até 65 anos	108	75,5
	>65 anos	35	24,5
Estado civil	casados	102	85,7
	não casados	17	14,3
Raça	branca	109	76,2
	não branca	34	23,8
Antecedentes Venéreos	sim	39	46,4
	não	45	53,6
Postectomia	sim	24	17,9
	não	110	82,1
Estadiamento cN**	N0	68	47,6
	N1	31	21,7
	N2	38	25,9
	N3	5	2,8
	Nx	3	2,1

*Foram excluídos os casos sem informação

**Estadiamento cTNM (EDGE et al. 2010)

A uretra estava acometida em 46% dos casos.

Os dados da frequência dos aspectos cirúrgicos e patológicos estão dispostos abaixo (Tabela 2).

Quanto aos subtipos histológicos do CaPe, a maior parte dos tumores foi classificado como sendo CEC usual (70,6%). Quando em associação com outros subtipos histológicos, a presença de CEC se deu em 111 casos

(77,6%). O segundo subtipo histológico isolado mais encontrado foi o Verrucoso e depois o Papilar, com seis e cinco casos, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2 - Frequência dos aspectos cirúrgicos e patológicos dos 143 pacientes portadores de CaPe.

Características	N	%
Estadiamento pT*		
T1	18	12,6
T2	66	46,2
T3	54	37,8
T4	5	3,5
Cirurgia do Tumor primário		
Postectomia	2	1,4
Amputação parcial	73	51
Amputação total	61	42,7
Emasculação	7	4,9
Tipo de invasão		
Regular	38	28,4
Irregular	96	71,6
Grau de diferenciação**		
Bem diferenciado	39	27,5
Moderadamente diferenciado	50	35,2
Pouco diferenciado	53	37,3
Invasão vascular**		
Ausente	105	78,4
Presente	29	21,6
Invasão perineural**		
Ausente	115	85,8
Presente	19	14,2
Invasão de corpo cavernoso		
Ausente	34	37
Presente	57	63
Invasão de corpo esponjoso		
Ausente	5	4,7
Presente	101	95,3
Invasão de uretra		
Ausente	40	54
Presente	34	46
Coilocitose		
Ausente	20	42,5
Presente	27	57,4
Metástase linfonodal		
Ausente	28	44,8
Presente	32	55,2

*Estadiamento pTNM (EDGE et al. 2010)

**Foram excluídos os casos sem informação

Tabela 3 - Subtipos histológicos da amostra de CaPe.

Tipo Histológico	N	%
CEC usual	101	70,6
Verrucoso	6	4,2
Papilar	5	3,5
Warty	5	3,5
Basalóide	4	2,8
Cunilatum	3	2,1
Pseudo glandular	2	1,4
Adenoescamoso	1	0,7
Anaplásico	1	0,7
Verrucoso invasivo	1	0,6
CEC + Verrucoso	6	4,2
CEC + Papilar	2	1,4
CEC + Warty + Verrucoso	1	0,7
CEC + Verrucoso + Anaplásico	1	0,7
Warty + Basalóide	2	1,4
Outros	2	1,4
Total	143	100

Com relação à metástase linfonodal, 58 pacientes foram submetidos a linfadenectomia sendo 12 profiláticas e 46 terapêuticas. Quanto ao tipo de esvaziamento linfonodal, 18 foram inguinais e 40 inguino-ilíacos. A média de linfonodos retirados por caso foi de 29,5. Do total de 58 linfadenectomias realizadas, 32 se confirmaram positivas após exame anátomo-patológico. Dados sobre as linfadenectomias realizadas encontram-se nas Tabelas 4-6.

Foram obtidos 10 prepúcios de recém-nascidos entre Março/2011 e Agosto/2011. O tempo de vida média foi de 17,6 dias (variando de 8 a 28 dias de vida).

Tabela 4 - Tipo de linfadenectomia realizada.

Linfadenectomia	Tipo	Casos	%
Não realizou		85	59,5
Realizou	Inguinal	18	12,5
	Inguino-ilíaca	40	28,0

Tabela 5 - Lateralidade do esvaziamento linfonodal realizado.

Linfadenectomia	Casos	%
Unilateral	5	8,6
Bilateral	53	91,4
Total	58	100

Tabela 6 - Complicações pós-operatórias das linfadenectomias realizadas.

Complicações	Casos	%
Infecção	1	1,6
Deiscência	2	3,2
Necrose de pele	1	1,6
Linfedema	5	8,1
Ruptura de vasos	2	3,2
Infecção + Deiscência	4	6,5
Deiscência + Necrose	9	14,5
Deiscência + Linfedema	2	3,2
Deiscência + Ruptura de vasos	1	1,6
Infecção + Deiscência + Necrose	6	9,7
Infecção + Deiscência + Linfedema	4	6,5
Deiscência + Necrose + Linfedema	9	14,5
Infecção + Deiscência + Necrose + Linfedema	6	9,7
Infecção + Deiscência + Necrose + Ruptura de vasos	1	1,6
Não houve complicações	9	14,5

3.2 REAÇÃO DE IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunoistoquímicas foram realizadas utilizando-se anticorpos monoclonais de coelho anti ciclina D1 (cone SP4). Utilizou-se o seguinte protocolo para as reações com IHC:

DESPARAFINIZAÇÃO DAS LÂMINAS

Desparafinização dos cortes de 3 µm de espessura, dos materiais incluídos em parafina e deixadas por 24 horas em estufa 60°C:

Xilol a 60°C por 20 minutos

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos

Etanol 100% 30 segundos

Etanol 85% 30 segundos

Etanol 70% 30 segundos

Lavadas as lâminas em água corrente e destilada.

RECUPERAÇÃO DE ANTÍGENOS

Fervida a solução tampão Tris - EDTA pH 9.0 em panela de pressão (Eterna Nigro®) destampada. Mergulhadas as lâminas na solução em ebulição. Lacrada a panela com a válvula levantada até eliminar o ar frio. Abaixada a válvula e após a pressurização total contar 4 minutos, foi desligada. Deixado a panela fechada sob água corrente até a despressurização total. Destampada a panela e lavadas as lâminas em água corrente e destilada.

BLOQUEIO DE PEROXIDASE ENDÓGENA

Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada. Lavadas em água corrente e destilada.

Lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos.

Incubadas as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Anticórpors	Clones	Títulos	Fabricantes
Ciclina D1	SP4	1:50	DakoCytomation, cod M3635, Carpinteria, Ca, EUA

Lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

SISTEMAS DE AMPLIFICAÇÃO

Incubadas por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).

Lavadas com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.

Incubadas com o NovoLink Polymer por 30 min a 37°C.

Lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

REVELAÇÃO COM CROMÓGENO

Incubadas as lâminas em solução substrato: 100 mg 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observadas ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

Lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos.

CONTRA COLORAÇÃO

Contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Lavadas bem em água corrente e destilada.

Imersas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

DESIDRATAÇÃO E MONTAGEM

Desidratar as lâminas em:

Etanol 80%, 30 segundos

Etanol 100%, 30 segundos

Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada

Xilol 4 vezes, 30 segundos cada

Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha)

CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

A fidelidade das lâminas sempre foi atestada através de controles positivos em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos estudados (hepáticos e tonsilas palatinas) e controle negativo, obtidos pela omissão dos anticorpos primários.

3.3 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação da reação IHQ, se deu utilizando o aparelho Scanscope XT Scanner System - Aperio Technologies, Inc., Vista CA, EUA. Este aparelho utiliza detectores de arranjo linear em conjunto com os componentes de controle de movimento em uma lente objetiva de microscópio óptico. Uma câmera com dispositivo de carga acoplada tradicional realiza a captura de várias regiões de uma lâmina em uma linha de varredura. Os fragmentos de imagem são alinhados para criar uma imagem digital de alta definição da lâmina histológica. Com a aquisição da imagem, utiliza-se um programa de digitalização da imagem onde a região representativa do tumor é demarcada, quantificada e são atribuídos valores à intensidade da marcação e são estratificados em um banco de dados (Figura 6). Os dados foram avaliados pelo algoritmo nuclear do aparelho. Esse algoritmo classifica a reação em 4 graus, sendo consideradas positivas as marcações 3+, 2+ e 1+, e como negativas aquelas indicadas como 0 (zero).

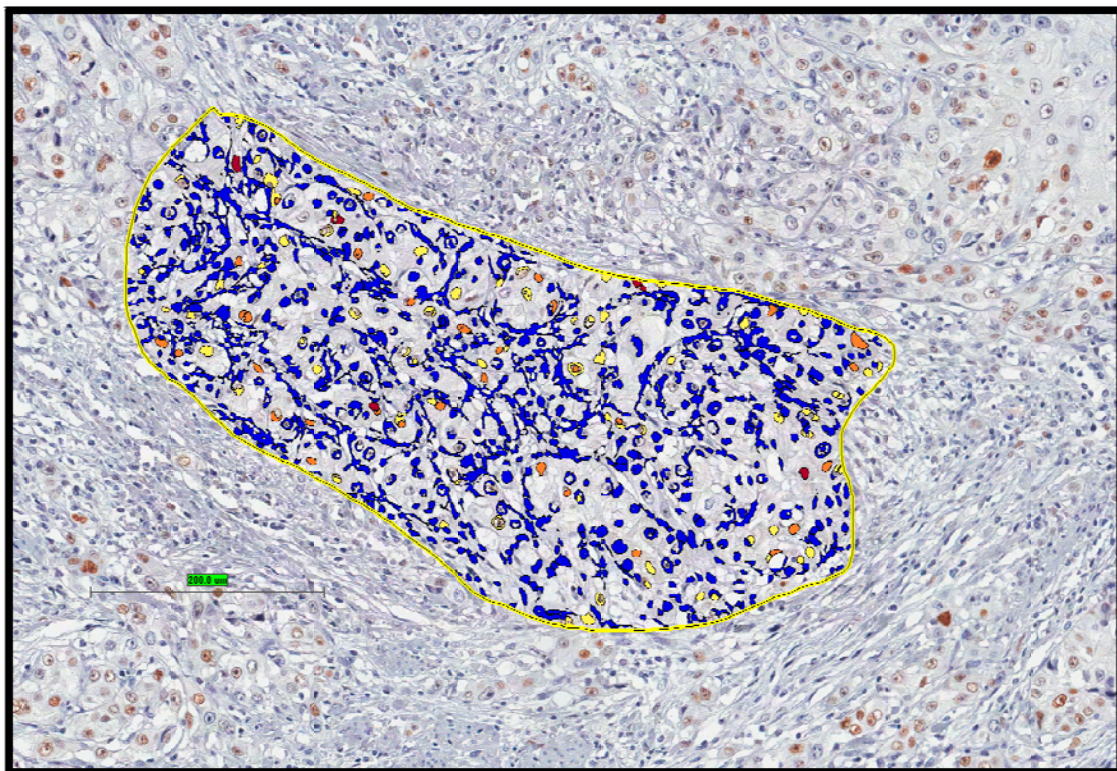


Figura 6 - Exemplo de demarcação da área de interesse com auxílio do software que determina a positividade nuclear para Ciclina D1 após digitalização da imagem.

A porcentagem média de células com reação IHC para Ciclina D1 no CdT, FIT, PNN, RN e CIS foi de: 6,87, 10,11, 7,23, 21,80 e 7,26 (respectivamente). Para a análise estatística, convencionamos que todos os casos cujas células apresentassem ao menos 10% de coloração em pelo menos um dos três níveis de expressão (1+, 2+ e 3+), seriam considerados positivos. Em contrapartida, os casos sem expressão ou que tivessem expressão inferior a 10% em todos os três níveis de expressão, seriam classificados como negativos. Doravante, esses dois grupos foram denominados: expressão positiva e negativa.

Tabela 7 - Categorização dos grupos para análise no estudo.

Grupos	Expressão da Ciclina D1	%
Positivo	somatória das porcentagens de células com expressão: 1+ ou 2+ ou 3+	≥10%
Negativo	ausência de expressão ou somatória de 1+, 2+ e 3+ menor do que 10%	<10%

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados através de prontuários dos pacientes utilizando-se uma ficha de levantamento de dados em CaPe (Anexo 5) e foram inseridos em um banco de dados utilizando-se o programa Social Sciences Software package, versão 20.0 para Mac (SPSS Chicago, IL).

Para avaliar a associação entre a expressão da Ciclina D1 e as outras variáveis clínico-patológicas, foi utilizado o teste Chi-quadrado bi-caudal de Pearson. O teste exato de Fisher foi aplicado nos casos cujas frequências observadas foram menores do que 5. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar médias entre as diferentes expressões da Ciclina D1.

A sobrevida câncer específica (SCE) foi definida como o intervalo entre a cirurgia do tumor primário e a última consulta médica de acompanhamento ou a morte relacionada à doença. A sobrevida global (SG) foi estabelecida como o intervalo entre a cirurgia do tumor primário e a última consulta médica ou a morte por qualquer causa. Aqueles indivíduos que perderam seguimento, foram classificados como censurados a partir do último contato. Para as análises de sobrevida utilizamos as curvas de

Kaplan-Meier e o teste 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. O resultado final para os modelos multivariados, regressão logística e de Cox foi obtido pela estratégia "stepwise backward selection". O intervalo de confiança utilizado foi de 5%. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DA CICLINA D1

4.1.1 Expressão da Ciclina D1 no prepúcio não-neoplásico hiperplásico (PNN)

Para a avaliação da Ciclina D1 no PNN foram testados 34 amostras de pacientes com CaPe sem alterações morfológicas de neoplasia no corte histológico. O número de células analisadas e medidas variou de 954 a 12680 com média de $4214,70 \pm 2733,27$ células por caso e mediana de 3403 células.

A expressão positiva da Ciclina D1 no PNN foi de 23,5% (Figura 7). Desta forma, apenas 8 casos dos 34 apresentaram positividade maior do que 10% nas células avaliadas.

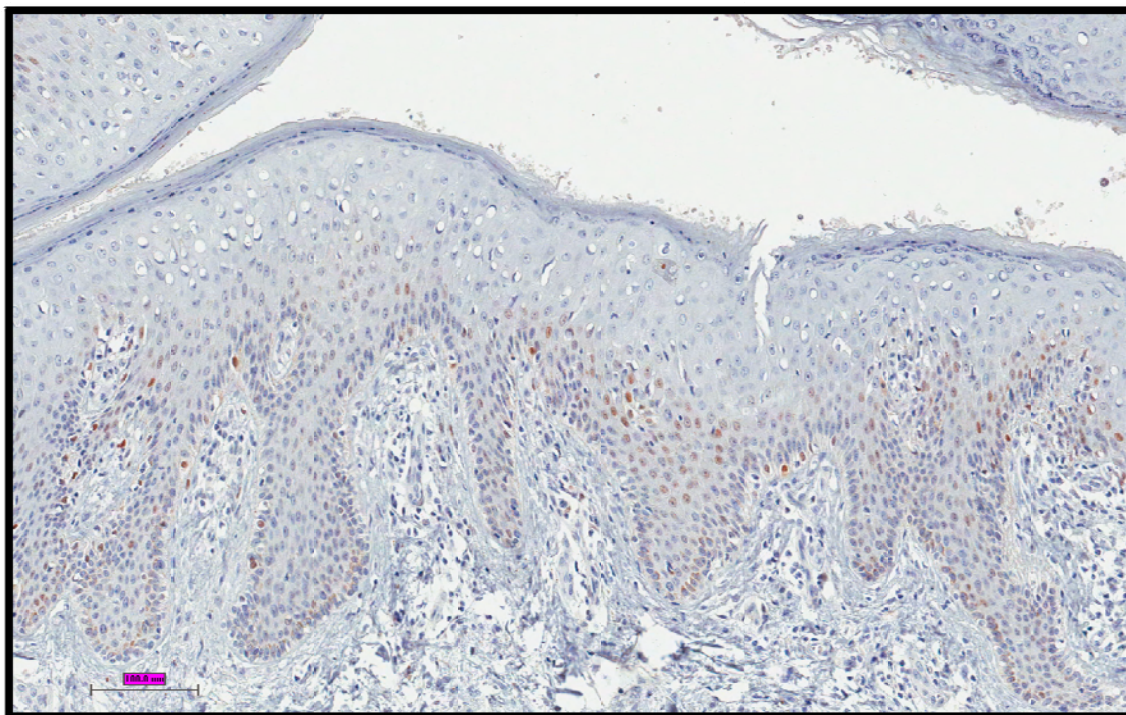


Figura 7 - Representação da reação de imunoistoquímica com expressão nuclear da Ciclina D1 no PNN (castanho).

4.1.2 Expressão da Ciclina D1 no centro do tumor (CdT)

Avaliamos o centro do tumor dos 146 casos de CaPe. O número médio de células avaliadas por caso foi de $8629,26 \pm 8623,28$ (variando de 1174 a 57770 células), com mediana de 5987 células.

A positividade para Ciclina D1 foi de 23,3% (34 casos) (Figura 8).

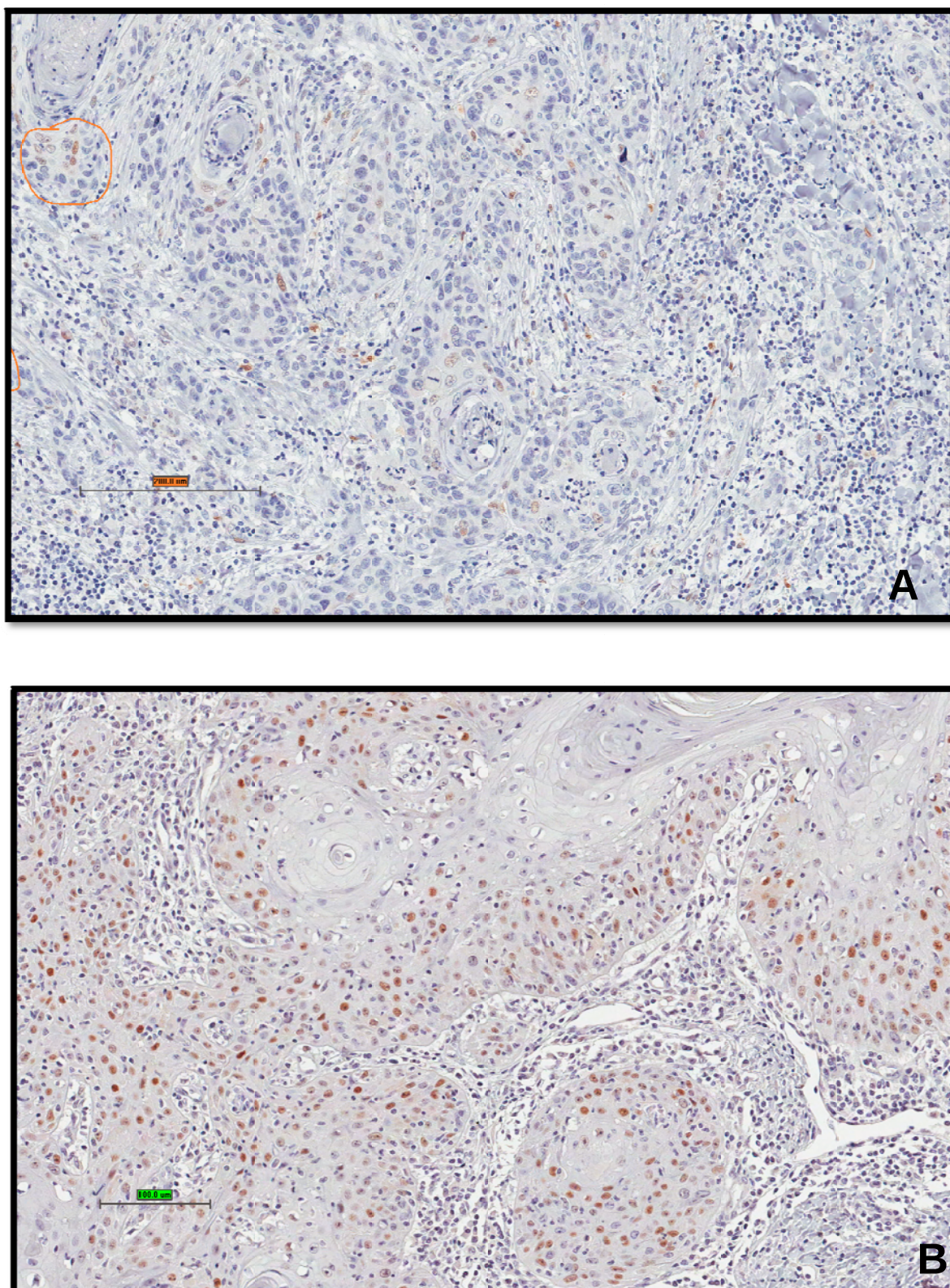


Figura 8 - Representação da reação de imunoistoquímica com: A) baixa expressão (1+) e B) alta expressão (3+) de Ciclina D1 no CdT.

4.1.3 Expressão da Ciclina D1 no fronte de invasão tumoral (FIT)

Com relação à expressão da Ciclina D1 no FIT, foram analisados os mesmos 146 casos da avaliação do CdT com variação do número de células contadas de 1093 a 17475 com média de $4641,97 \pm 2707,88$ células do tumor com mediana de 4036,50.

O percentual de expressão da Ciclina D1 no FIT foi de 37% (54 casos). A expressão no FIT está demonstrada na Figura 9.

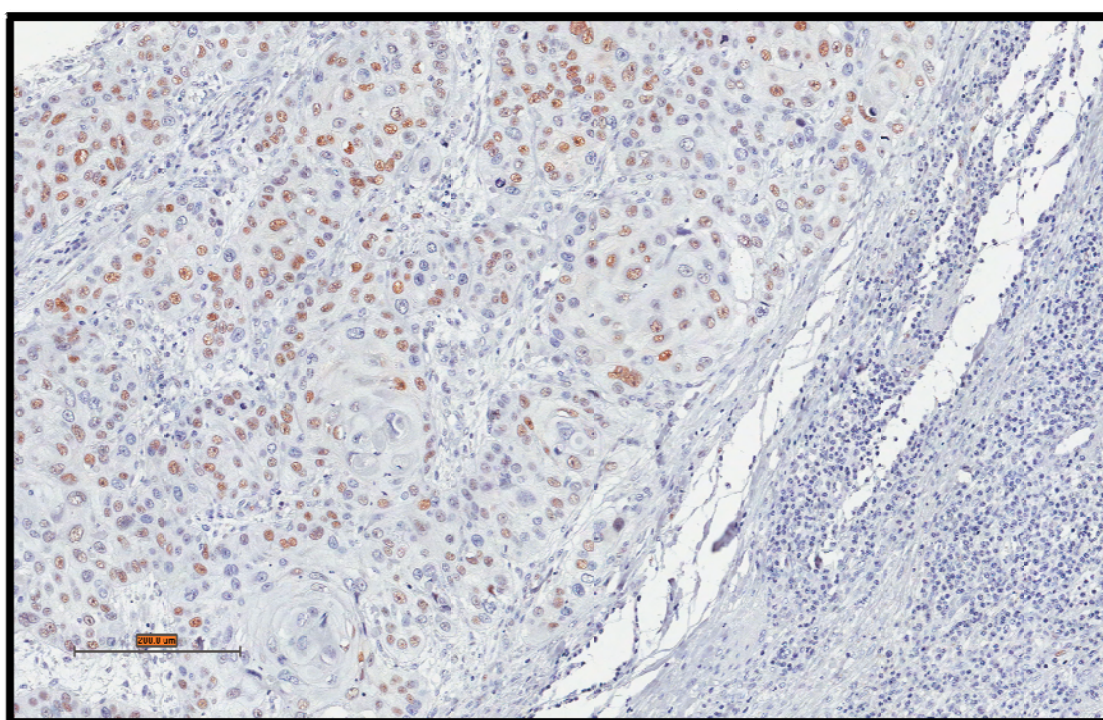


Figura 9 - Representação do FIT com alta expressão (3+) da Ciclina D1.

4.1.4 Expressão da Ciclina D1 no carcinoma *in situ* (CIS)

A presença de CIS em regiões peritumorais, foi encontrada em 15 casos. A média do número de células observadas foi de $4628,66 \pm 5060,14$ (variando de 1665 a 22098).

A expressão positiva para Ciclina D1 nestes casos foi de 20%.

4.1.5 Expressão da Ciclina D1 no prepúcio de recém-nascidos (RN)

Para avaliar a expressão da Ciclina D1 neste tecido, foram avaliadas em média 7488,50 células (variando de 4291 a 11333 e desvio-padrão de 2441,40).

Nove entre os 10 casos avaliados apresentaram expressão superior a 10% e foram considerados positivos (90%), conforme Figura 10.

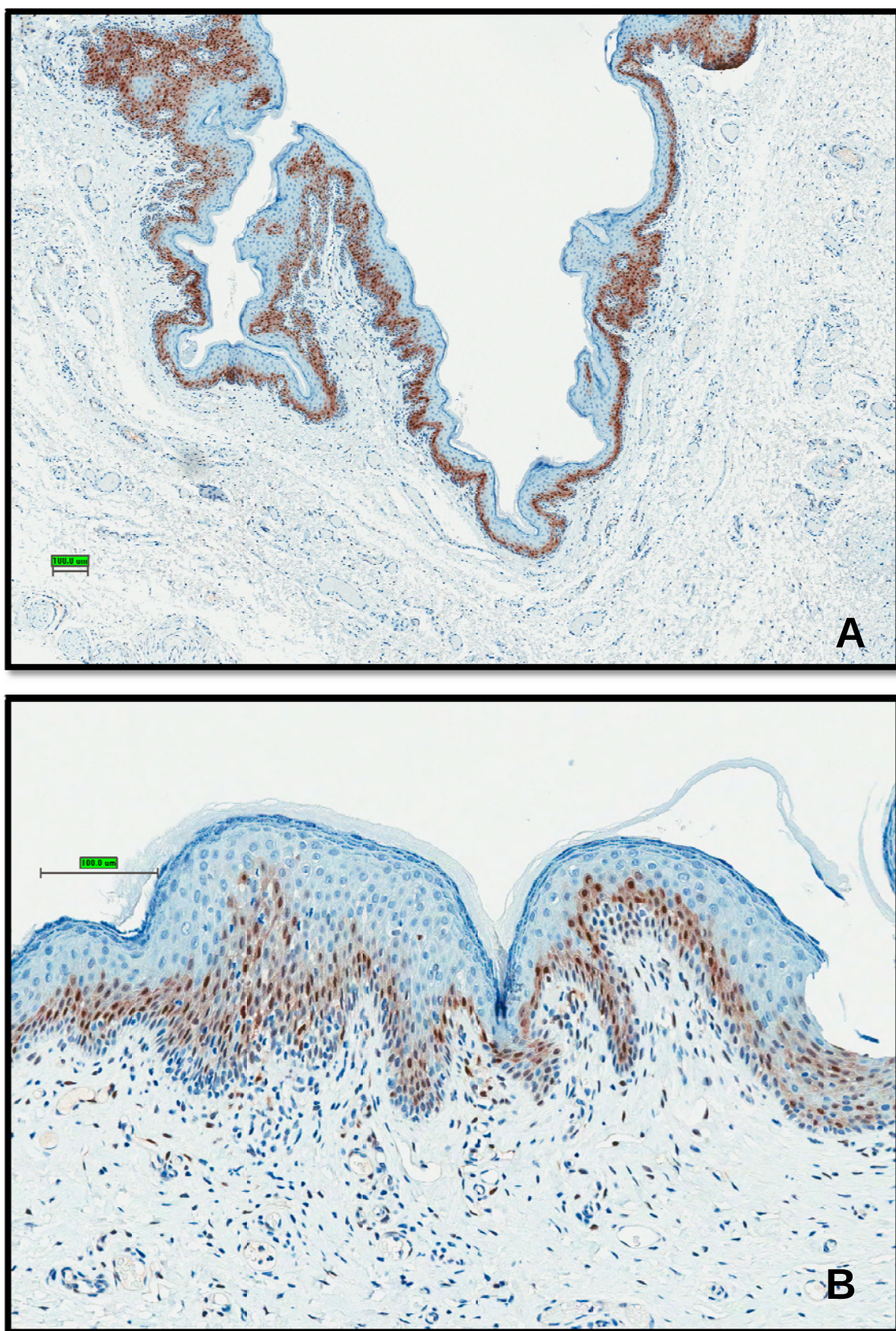


Figura 10 - Representação da expressão da Ciclina D1 no prepúcio de RN demonstrando forte reação (3+) em: A) menor aumento; e B) maior aumento.

4.1.6 Comparação da expressão da Ciclina D1 no PNN, CdT, FIT, CIS e RN

A positividade na expressão da Ciclina D1 pode ser vista através da Tabela 8 e da Figura 11 ("boxplot").

Tabela 8 - Comparação entre a variação da expressão da Ciclina D1 no PNN, CdT, FIT, CIS e no RN, conforme a intensidade da reação.

	CdT(%)	FIT(%)	PNN(%)	RN(%)	CIS(%)
Média±DP de células3+	0,75±2,27	1,20±3,35	0,44±0,72	4,97±4,46	0,71±1,09
Variação de células 3+	0,0-19,89	0,0-27,01	0,0-2,78	0,28-13,96	0,04-3,5
Média±DP de células2+	1,47±2,53	2,4±0,97	1,47±1,88	6,99±3,24	1,68±1,91
Variação de células 2+	0,0-11,71	0,0-17,89	0,0-8,55	0,85-12,69	0,04-6,85
Média±DP de células1+	4,58±4,43	6,54±5,23	5,31±3,76	9,82±3,08	4,86±3,49
Variação de células 1+	0,24-41,76	0,15-23,08	0,53-18,96	2,54-12,92	0,30-10,99

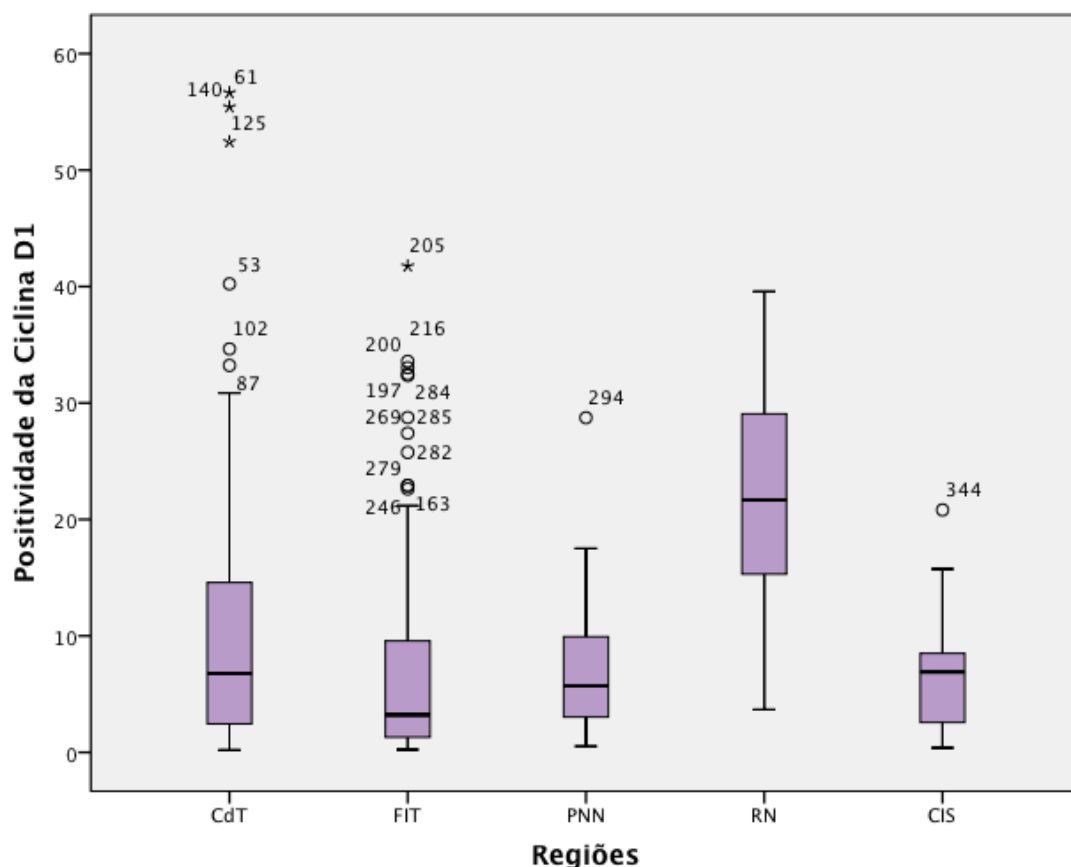


Figura 11 - Positividade para a Ciclina D1 conforme as regiões.

4.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CICLINA D1 E OS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Com relação aos parâmetros clínicos e demográficos, não encontramos associação entre as expressões da Ciclina D1 (positiva ou negativa), tanto no CdT, FIT, PNN ou CIS, com: idade ($\geq$ ou <65 anos), raça, antecedente pessoal de doença venérea ou estado civil dos pacientes ($p > 0,05$).

Comparando-se a Ciclina D1 com os parâmetros patológicos, evidenciou-se uma associação entre o grau histológico e a positividade da expressão apenas no FIT ($p = 0,026$). Verificamos que os pacientes de baixo grau tiveram o maior contingente de expressão negativa e o menor percentual de expressão positiva. Entre os tumores de grau intermediário, os índices de expressão positiva e negativa foram quase idênticos (Tabela 9). No CdT, houve apenas uma tendência de associação do grau ($p = 0,062$). No PNN e no CIS, não encontramos tal associação ($p = 0,150$ e $p = 0,189$ respectivamente).

Tabela 9 - Associação entre o grau histológico tumoral e a expressão da Ciclina D1 no FIT.

		<u>Positividade da Ciclina D1</u>		Total
		Negativa	Positiva	
Grau Histológico	Baixo Grau	31(79,5%)	8(20,5%)	39
	Intermediário	26(52%)	24(48%)	50
	Alto Grau	32(60,3%)	21(39,7%)	53

p=0,026

Com relação ao estadiamento tumoral (pT), observamos que não houve associação com a expressão da Ciclina D1 em nenhuma das regiões estudadas ($p>0,05$). Da mesma forma, não encontramos associação com o padrão de invasão do tumor (infiltrativo ou "infiltrating" vs. deslocador ou "pushing") nem com a presença de invasão perineural ou invasão vascular microscópica ($p>0,05$).

As variáveis patológicas (estadiamento pT, metástase linfonodal, padrão de invasão do tumor, invasão vascular, invasão perineural, invasão de corpo esponjo, cavernoso e invasão uretral) estão descritas na tabela abaixo de acordo com a expressão da Ciclina D1 nas diferentes regiões estudadas (Tabela 10).

Tabela 10 - Associação entre os parâmetros patológicos e a expressão da Ciclina D1 no: CdT, FIT e CIS.

Parâmetros Patológicos		Ciclina D1 CdT			Ciclina D1 FIT			Ciclina D1 CIS		
Estadiamento T		Neg	Pos	valor p	Neg	Pos	valor p	Neg	Pos	valor p
	T1	14	4	,416	11	7	,545	5	0	,287
	T2	47	19		38	28		6	2	
	T3	43	11		38	16		1	1	
	T4	5	0		3	2		-	-	
Metástase Linfonodal										
	Ausente	22	4	,136	15	11	,728	3	0	-
	Presente	21	11		17	15		1	0	
Padrão de Invasão										
	Deslocador	29	9	,973	27	11	,249	1	2	,127
	Infiltrativo	73	23		58	38		8	1	
Invasão Vascular										
	Ausente	80	25	,724	67	38	,965	10	2	,231
	Presente	23	6		19	10		0	1	
Invasão Perineural										
	Ausente	89	26	,723	76	39	,257	10	2	,231
	Presente	14	5		10	9		0	1	
Invasão de Corpo Esponjoso										
	Ausente	4	1	1,0	2	3	,347	1	0	1,0
	Presente	78	23		66	35		9	3	
Invasão de Corpo Cavernoso										
	Ausente	25	9	,203	22	12	,405	5	1	1,0
	Presente	44	13		37	20		2	1	
Invasão Uretral										
	Ausente	33	7	,125	28	12	,318	6	1	1,0
	Presente	27	7		24	10		2	0	

4.2.1 Associação entre a expressão de Ciclina D1 com metástase linfonodal

As tabelas que seguem demonstram a associação entre o comprometimento linfonodal clínico (cN) e a positividade linfonodal após linfadenectomia, com relação à expressão da Ciclina D1 nas diferentes regiões (Tabelas de 11 a 13). Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a expressão da Ciclina D1 com o estadiamento clínico de envolvimento linfonodal nem com a metástase linfonodal após linfadenectomia dos casos selecionados ($p > 0,05$).

Tabela 11 - Associação da expressão da Ciclina D1 no CdT.

Variável	Categoria	Expressão da Ciclina D1		p
		Negativa	Positiva	
Estadiamento cN	N0	52	17	,984
	N1	24	7	
	N2	30	8	
	N3	4	1	
Metástase linfonodal	Ausente	24	4	,085*
	Presente	22	11	

*Variável selecionada para regressão logística

Tabela 12 - Associação da expressão da Ciclina D1 no FIT.

Variável	Categoria	Expressão da Ciclina D1		p
		Negativa	Positiva	
Estadiamento cN	N0	44	25	,586
	N1	16	15	
	N2	27	11	
	N3	3	2	
Metástase linfonodal	Ausente	16	12	,839
	Presente	18	15	

Tabela 13 - Associação da expressão da Ciclina D1 no CIS.

Variável	Categoria	Expressão da Ciclina D1		p
		Negativa	Positiva	
Estadiamento cN	N0	9	2	,092
	N1	3	0	
	N2	0	1	
	N3	0	0	
Metástase linfonodal	Ausente	3	0	-
	Presente	1	0	

4.3 AVALIAÇÃO DE RISCO DE METÁSTASE LINFONODAL

Foram realizadas 58 linfadenectomias sendo 18 inguinais apenas e 40 inguino-ilíacas. A sobrevida em 5 anos dos pacientes com metástase linfonodal em comparação com aqueles sem metástase foi de 54,1% e 87,5%, respectivamente.

A Análise univariada

Dentre as variáveis clínico-demográficas e patológicas avaliadas, a que se associou com a presença de metástase linfonodal na análise univariada foi o grau histológico do tumor ($p=0,08$) (Tabela 14). A maioria dos casos com permeação linfonodal foi de tumores de alto grau.

Tabela 14 - Associação entre a metástase linfonodal e variáveis demográficas, clínicas e patológicas.

Variável	Categoria	Metástase linfonodal		p
		Ausente	Presente	
Idade	até 65 anos	21	27	,740
	>65 anos	5	5	
Raça	Branca	17	25	,280
	Não branca	9	7	
Doença Venérea	sim	6	13	,420
	não	8	10	
Postectomia	sim	17	28	,119*
	não	5	2	
Estadiamento cN**	Negativo	9	4	,061*
	Positivo	17	28	
Estadiamento pT*	T1	1	2	,788
	T2	12	11	
	T3	11	17	
	T4	2	2	
Tipo de invasão	Regulares	4	9	,349
	Irregulares	2	22	
Grau	I	7	2	,008**
	II-III	19	30	
Invasão de Corpo Esponjoso	Ausente	1	1	1,0
	Presente	18	21	
Invasão de Corpo Cavernoso	Ausente	4	6	,704
	Presente	9	20	
Invasão Uretral	Ausente	6	8	,710
	Presente	5	10	
Invasão Vascular	Ausente	20	18	,076*
	Presente	4	13	
Invasão Perineural	Ausente	19	22	,489
	Presente	5	9	
Presença de Coilocitose	Ausente	10	9	,976
	Presente	12	11	

*Foram excluídos os casos sem informação**Variável selecionada para regressão logística

B Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada (para metástase linfonodal) foram selecionadas para a análise multivariada. Foram incluídas para análise também aquelas variáveis que atingiram valores de p até 0,2 (Tabela 15).

Tabela 15 - Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para metástase linfonodal.

Variável	p(Log Rank)
Postectomia	,119
Ciclina D1 (CdT)	,085
Invasão vascular	,076
Estadiamento cN	,061
Grau histológico	,008

No modelo multivariado, a única que se mostrou ter valor estatisticamente significativo foi o grau histológico (RR=2,511; IC 95% [1,315-4,795]) (Tabela 16).

Tabela 16 - Resultado da análise multivariada para sobrevida global.

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Grau histológico	I	1	Ref.
	II-III	2,511	1,315-4,795

4.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.4.1 Sobrevida global

A Análise univariada

A sobrevida global em 5 e 10 anos para os 143 pacientes portadores de CaPe foi de 63,6% e 42,0%, respectivamente (Figura 12).

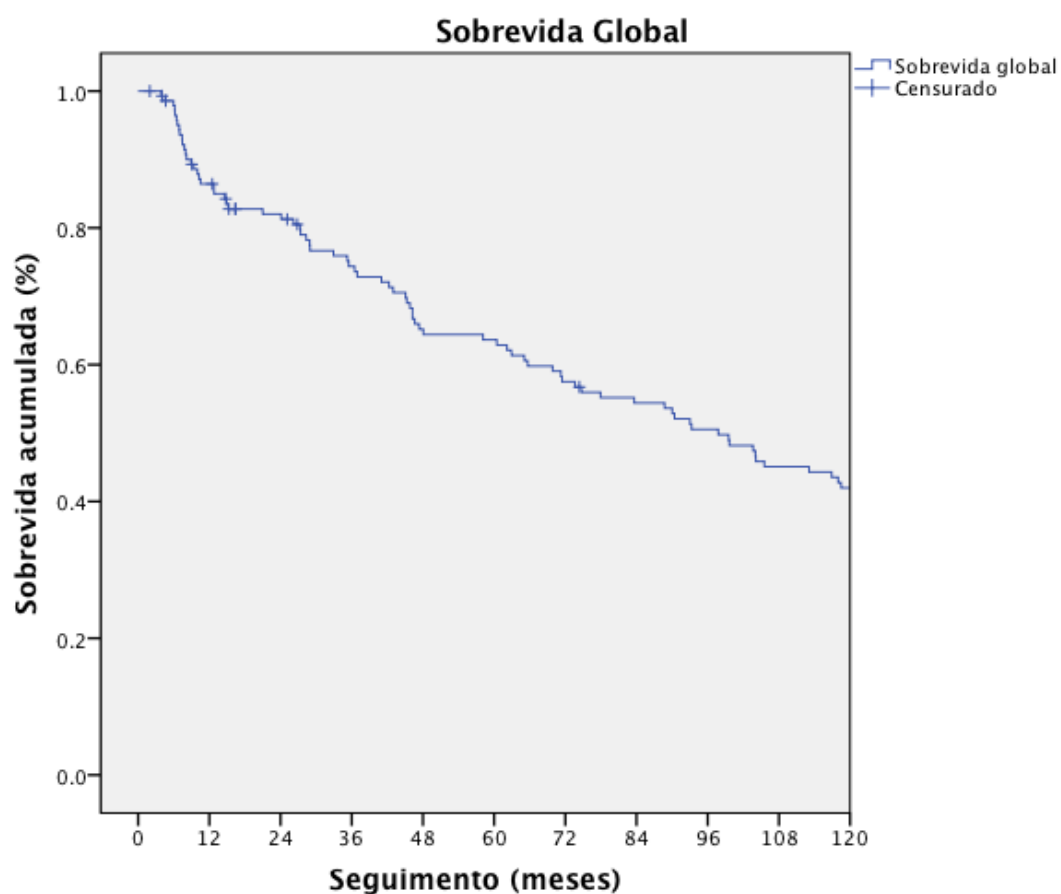


Figura 12 - Curva de sobrevida global para os 143 pacientes portadores de CaPe, não estratificado por nenhuma das variáveis estudadas.

Com relação às variáveis clínicas e demográficas que influenciaram significativamente a sobrevida global em 5 anos, estão a idade ($p=0,028$) e o estadiamento clínico dos linfonodos ($p=0,026$) (Tabela 17).

Tabela 17 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 143 pacientes portadores de CaPe.

Variável	Categoria	N	Sobrevida global (5 anos)	p(Log Rank)
Estado civil	Solteiro	8	50%	,198* **
	Casado	102	65,9%	
	Outros	9	53,3%	
Idade	<65 anos	108	69,6%	,028**
	>65 anos	35	48,9%	
Raça	Branco	109	65%	,710
	Não Branco	34	62,4%	
Tempo de evolução	<12 meses	77	59,4%	,067**
	≥12 meses	62	71,8%	
Antecedente de doença venérea	Não	45	61%	,649
	Sim	39	57,5%	
Postectomia	Não	110	63%	,347
	Sim	24	67,5%	
Estadiamento cN	N0	68	66,4%	,026**
	N1	31	60%	
	N2	37	68,8%	
	N3	4	25%	

*Excluídos os casos sem informação

**Variável selecionada para regressão logística

Com relação às variáveis anatomopatológicas, aquelas que influenciaram significativamente a sobrevida global, encontram-se: grau histológico ($p=0,001$), invasão vascular ($p=0,000$) e invasão perineural ($p=0,000$) (Tabela 18).

Tabela 18 - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis patológicas em 143 pacientes portadores de CaPe.

Variável	Categoria	N	Sobrevida global (5 anos)	p(Log Rank)
Estadiamento pT	T1	18	56,9%	,095**
	T2	66	73,2%	
	T3	54	58,7%	
	T4	5	40%	
Metástase linfonodal	Não	26	61,2%	,138**
	Sim	32	50,2%	
Tipo de invasão	Regular	38	72,8%	,249*
	Irregular	96	60,2%	
Grau	Baixo	39	86,1%	,001**
	Intermediário	50	62,6%	
	Alto	53	50,1%	
Invasão de corpo esponjoso	Não	5	25%	,085**
	Sim	101	69%	
Invasão de corpo cavernoso	Não	34	66%	,449*
	Sim	57	54,2%	
Invasão de uretra	Não	40	54,5%	,547
	Sim	34	53,6%	
Invasão vascular	Não	105	71,5%	,000**
	Sim	29	38,5%	
Invasão perineural	Não	115	69,7%	,000**
	Sim	19	28,7%	
Ciclina D1 (PNN)	Negativa	26	58,1%	,904
	Positiva	8	57,1%	
Ciclina D1 (CdT)	Negativa	109	66,9%	,325
	Positiva	34	56,7%	
Ciclina D1 (FIT)	Negativa	90	69,6%	,130**
	Positiva	53	55,4%	
Ciclina D1 (CIS)	Negativa	12	55,6%	,416
	Positiva	3	66,7%	

*Excluídos os casos sem informação

**Variável selecionada para regressão logística

B Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada (para sobrevida global) foram selecionadas para a análise multivariada. Foram incluídas para análise também aquelas variáveis que atingiram valores de p até 0,2 (Tabela 19).

Tabela 19 - Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida global.

Variável	p(Log Rank)
Estado civil	,198
Permeação linfática	,138
Ciclina D1 (FIT)	,130
Estadiamento pT	,095
Invasão de corpo esponjoso	,085
Idade	,028
Estadiamento cN	,026
Grau histológico	,001
Invasão vascular	,000
Invasão perineural	,000

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a invasão perineural (RR=6,412; IC 95% [1,785-23,035]) foi o único fator para sobrevida global (Tabela 20).

Tabela 20 - Modelo multivariado para a sobrevida global em pacientes portadores de carcinoma peniano em 143 pacientes.

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Invasão Perineural	Não	1	Ref.
	Sim	6,412	1,785-23,035

4.4.2 Sobrevida câncer específica

A sobrevida câncer específica em 5 e 10 anos para os 143 casos de CaPe foi de 79,6% e 73,8%, respectivamente.

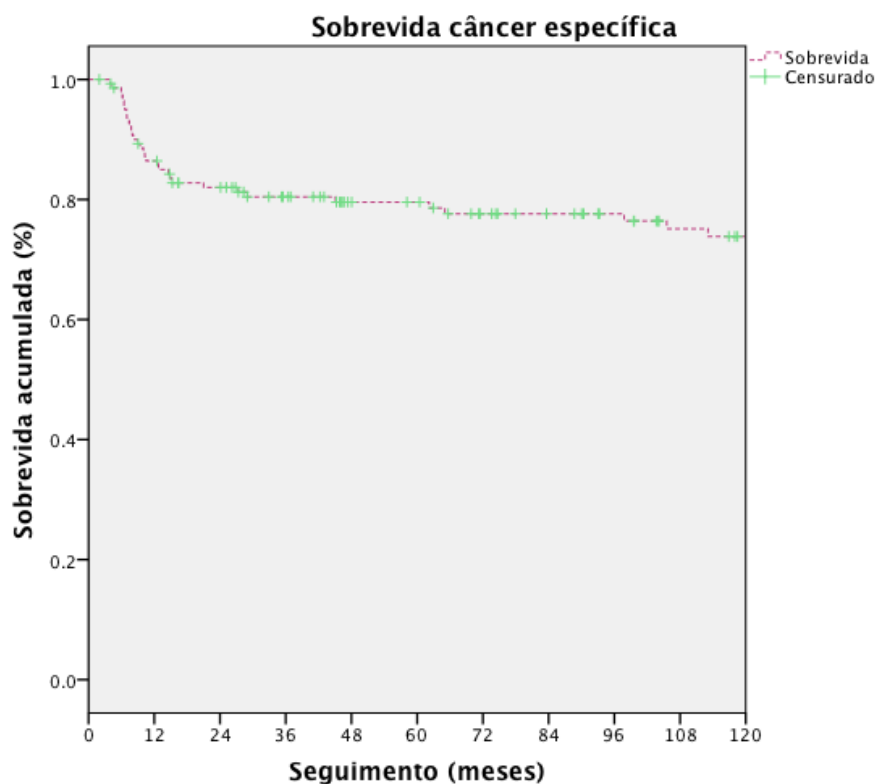


Figura 13 - Curva de sobrevida câncer específica para os 143 pacientes portadores de CaPe, não estratificado por nenhuma das variáveis estudadas.

A Análise univariada

Com relação à análise univariada dos aspectos clínicos e demográficos, evidenciou-se relação com a sobrevida câncer específica: estado civil ($p=0,014$) e o estadiamento clínico dos linfonodos ($p=0,007$) (Tabela 21).

Tabela 21 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 143 pacientes portadores de CaPe.

Variável	Categoria	N	Sobrevida câncer específica (5 anos)	p(Log Rank)
Estado civil	Solteiro	8	37,5%	,014* **
	Casado	102	83,5%	
	Outros	9	66,7%	
Idade	<65 anos	108	80,5%	,646
	>65 anos	35	76,2%	
Raça	Branco	109	79,9%	,271
	Não Branco	34	77,9%	
Tempo de evolução	<12 meses	77	76%	,322*
	≥12 meses	62	71,8%	
Antecedente de doença venérea	Não	45	74,2%	,537*
	Sim	39	73,2%	
Postectomia	Não	110	77,4%	,445*
	Sim	24	76,1%	
Estadiamento cN	N0	68	84,6%	,007* **
	N1	31	74,4%	
	N2	37	80,7%	
	N3	4	25%	

*Excluídos os casos sem informação

**Variável selecionada para regressão logística

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram a sobrevida câncer específica, estão: permeação linfática ($p=0,017$), o grau histológico ($p=0,000$), invasão vascular ($p=0,000$) e invasão perineural ($p=0,001$). Não houve alteração da sobrevida câncer específica relacionada à expressão da Ciclina D1, tanto no PNN, CdT, FIT ou CIS (Tabela 22).

Tabela 22 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 143 pacientes portadores de CaPe.

Variável	Categoria	N	Sobrevida global (5 anos)	p(Log Rank)
Estadiamento pT	T1	18	74,7%	,060**
	T2	66	90,7%	
	T3	54	70,8%	
	T4	5	40%	
Metástase linfonodal	Não	26	87,5%	,005**
	Sim	32	49,9%	
Tipo de invasão	Regular	38	78,4%	,964*
	Irregular	96	78,1%	
Grau	Baixo	39	91,8%	,000**
	Intermediário	50	87,7%	
	Alto	53	61,9%	
Invasão de corpo esponjoso	Não	5	75%	,958*
	Sim	101	79,2%	
Invasão de corpo cavernoso	Não	34	81,7%	,148***
	Sim	57	65,3%	
Invasão de uretra	Não	40	75,4%	,517*
	Sim	34	61,8%	
Invasão vascular	Não	105	85,8%	,000**
	Sim	29	53,6%	
Invasão perineural	Não	115	84,4%	,001**
	Sim	19	41,8%	
Ciclina D1 (PNN)	Negativa	26	70,2%	,457
	Positiva	8	85,7%	
Ciclina D1 (CdT)	Negativa	109	80,6%	,739
	Positiva	34	67,2%	
Ciclina D1 (FIT)	Negativa	90	82,5%	,170**
	Positiva	53	74,1%	
Ciclina D1 (CIS)	Negativa	12	-	- ***
	Positiva	3		

*Excluídos os casos sem informação

**Variável selecionada para regressão logística

***Grupo não apresentou mortalidade câncer específica no período

B Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada (para sobrevida câncer específica) foram selecionadas para a análise multivariada. Foram incluídas para análise também aquelas variáveis que atingiram valores de p até 0,2 (Tabela 23).

Tabela 23 - Lista de variáveis por ordem de entrada na análise multivariada de sobrevida câncer específica.

Variável	p(Log Rank)
Ciclina D1 (FIT)	,170
Invasão de corpo cavernoso	,148
Estadiamento pT	,060
Estado civil	,014
Estadiamento cN	,007
Metástase linfonodal	,005
Invasão perineural	,001
Grau histológico	,000
Invasão vascular	,000

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, apenas invasão perineural (RR=7,155; IC 95% [1,824-28,071]) foi fator independente de risco para a sobrevida câncer específica (Tabela 24).

Tabela 24 - Modelo multivariado para a sobrevida câncer específica em pacientes portadores de carcinoma peniano em 143 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Invasão Perineural	Não	1	Ref.
	Sim	7,155	1,824-28,071

4.4.3 Sobrevida relacionada à metástase linfonodal

Metástase linfonodal foi encontrada em 32 dos 58 procedimentos de linfadenectomia (55,2%). Ao analisarmos a sobrevida dos pacientes que foram submetidos a linfadenectomia, aqueles que apresentavam metástase linfonodal tiveram sobrevida em 5 anos de 54,1%, em comparação com aqueles sem metástase linfonodal: 87,5% ($p=0,005$) (Figura 14).

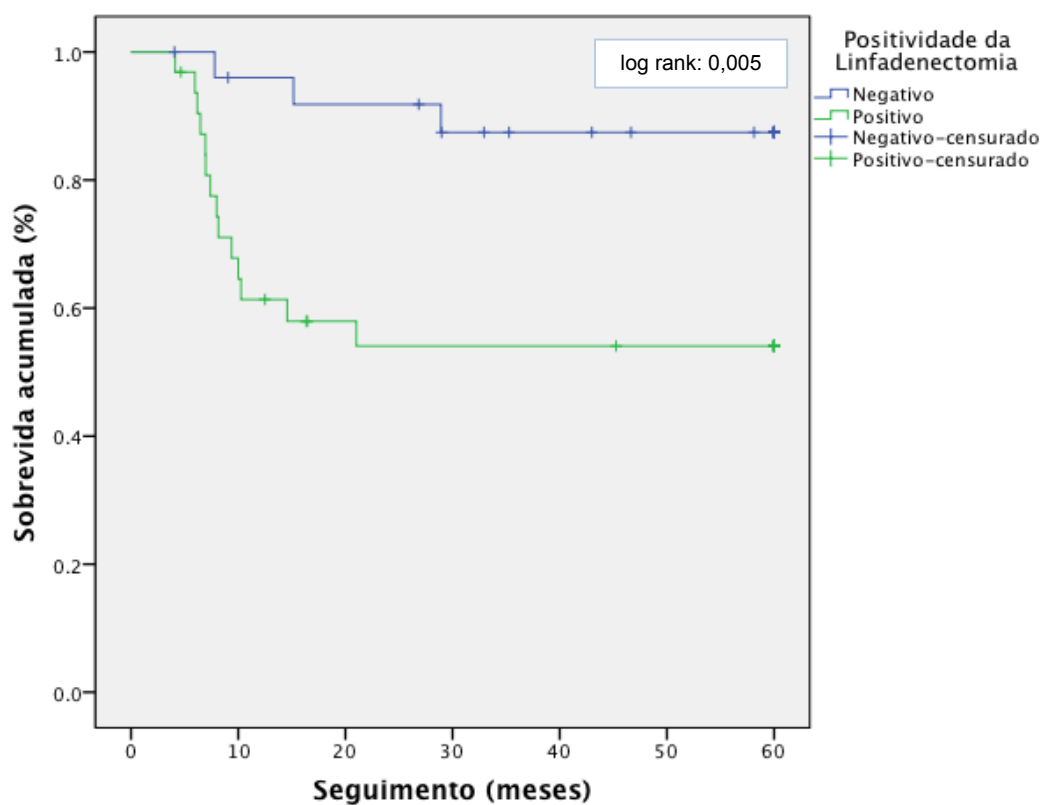


Figura 14 - Sobrevida relacionada ao acometimento linfonodal.

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

O câncer de pênis continua a ser um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, como o Brasil. E mesmo neste país, há grande diferença de incidência entre as regiões, sendo mais comuns no norte e nordeste. Esse fato é corroborado por estudo epidemiológico recente que observou que as regiões citadas detêm 53,02% dos casos de CaPe do país (FAVORITO et al. 2008). Possivelmente isso se deva a uma condição precária de vida. Estudo realizado na Dinamarca, entre 1943 e 1990, credita a diminuição da incidência de CaPe à melhora das condições sanitárias daquele país nesse período (FRISCH et al. 1995).

A idade média dos pacientes do estudo ficou em $54,43 \pm 13,53$ anos (variando de 24 a 85 anos). Na literatura internacional encontramos que o CaPe afeta mais frequentemente homens entre 50 e 70 anos de idade. Todavia, pode acometer pacientes mais jovens (19% dos casos em menores de 40 anos e 7% abaixo dos 30 anos de idade) (POW-SANG et al. 2010). Isso vai de acordo com recente estudo patrocinado pela sociedade Brasileira de Urologia que demonstrou acometimento de homens com menos de 26 anos (3,5%); 27 a 35 anos (3,88%); 35 a 45 anos (12%) e 46 a 55 anos (18,72%) (FAVORITO et al. 2008). Verificar homens tão jovens acometidos por essa neoplasia em nosso país, corrobora a necessidade de estudos

sobre diversas facetas do CaPe, como tem sido realizado em nosso grupo (LOPES et al. 1996; GUIMARÃES 2003, 2006, 2007, 2011; ZEQUI et al. 2011).

Houve demora na procura de assistência médica na nossa população de estudo ($12,95 \pm 16,13$ meses, variando de 1 a 108 meses), corroborando dados da literatura (BUDDINGTON et al. 1963; LOPES et al. 1994). No Brasil, além dos aspectos culturais há dificuldade de acesso à saúde em algumas regiões, principalmente aquelas que já possuem condições socioeconômicas piores, contribuindo ainda mais para a progressão da doença. No presente estudo, 87,4% dos pacientes já se apresentaram com doença invasiva $\geq T2$. A despeito das precárias condições socioeconômicas, talvez o despreparo do médico generalista para colaborar para a demora. Possivelmente a demora na indicação da biópsia da lesão peniana e mesmo baixa qualidade do exame físico de um órgão externo e facilmente analisável contribuem para o retardo diagnóstico.

Dentre os fatores de risco já estabelecidos, diversos estudos incluem a presença de fimose, tabagismo, verrugas genitais, antecedente de doenças venéreas e número de parceiras sexuais fora do casamento (BRINTON et al. 1991; TSEN et al. 2001). A realização de postectomia na idade infantil/adolescência mostrou ser importante fator protetor para o câncer invasivo do pênis, quando associado a fimose (DALING et al. 2005; LARKE et al. 2011; MORRIS et al. 2011). Enquanto estudos americanos demonstram que a postectomia é uma das cirurgias mais realizadas naquele país, sendo que em 1992 62% dos meninos nascidos foram submetidos à

esse procedimento, a média mundial é de 1 postectomia para cada 6 nascimentos. O nosso estudo mostrou incidência semelhante, com 17,9% dos pacientes postectomizados.

O acometimento linfonodal é o principal fator prognóstico no câncer de pênis e a linfadenectomia a única forma de cura quando a doença já se encontra nos linfonodos. No entanto, este procedimento não é isento de complicações. Como pudemos constatar, nos 58 casos que foram submetidos a linfadenectomia, a taxa de complicação foi de 85,5%. Já houve modificações técnicas com o intuito de diminuir essas complicações (CATALONA 1988) e a vídeo cirurgia tem se mostrado uma alternativa nos últimos anos (TOBIAS-MACHADO et al. 2006, 2007, 2011).

Há grande dificuldade em conseguirmos identificar os pacientes que devem ser submetidos à linfadenectomia. Sabemos de longa data que mesmo aqueles pacientes que não se apresentam com acometimento linfonodal possuem metástase oculta em 20% dos casos (CATALONA 1980). No nosso estudo, observamos que a positividade da linfadenectomia foi de 55,2%. Assim a busca de marcadores biomoleculares que possam auxiliar na seleção de candidatos a linfadenectomia faz-se necessária.

5.2 METODOLOGIA

Sabemos que a metodologia de imunoistoquímica é passível de inúmeros pontos de falha (ZEQUI 2000; YAZIJI e BARRY 2006; FRITSCHY 2008). O longo tempo e as condições de armazenamento tecidual, emprego

de formol não tamponado, aspectos dos diversos passos desde a desparafinização, desidratação tecidual, recuperação antigênica, ação de corantes endógenos e qualidade de anticorpos primários e secundários, a espessura do material seccionado, a adesivagem das lâminas, tudo isto pode influenciar positiva ou negativamente a antigenicidade tecidual e qualidade das reações. A experiência e motivação dos indivíduos envolvidos na leitura e interpretação do material permitem também vieses de subjetividade.

Ressaltamos que nesse estudo, o material foi coletado a partir de 1954 podendo ter sofrido ação do tempo. Embora estejamos num centro de excelência e sabemos que sempre os espécimes cirúrgicos foram estocados e parafinados sob as melhores condições de cada época, o tempo e o desgaste dos blocos, por repetidos estudos age indubitavelmente podendo reduzir na preservação antigênica tecidual e não pode ser interrompido por nossa ação. Além disso as técnicas de preservação sofrem mudanças no sentido de melhora. A partir de 1997, passou-se a empregar o formol tamponado nesta instituição, o que permite maior preservação de antígenos teciduais, conforme demonstrado em tese de membros de nosso grupo.

Nesta casuística, a maioria dos casos são de décadas anteriores, o que poderia colaborar com uma menor expressão do marcador se considerarmos essas questões acima, entretanto praticamente todas estiveram sob essas mesmas condições. Curiosamente, os prepúcios dos recém-nascidos que expressaram fortemente o marcador são tecidos recém obtidos (nos últimos dois anos) e seguramente não foram influenciados por

tempo e condições de estocagem mas achamos que isso não é a principal causa de sua alta expressão, mas sim o já discutido maior “turnover” celular destes bebês e o processo cicatricial que é mais intenso em crianças, com grande riqueza de colágeno tecidual em comparação aos adultos na faixa etária estudada. Na microfotografia podemos verificar a extensa camada ceratinizada destes prepúcios. Talvez isso promova maior integridade arquitetural tecidual e permita maior expressão da ciclina D1.

Por outro lado, ressaltamos práticas que garantem a qualidade e representatividade dos processos realizados neste estudo: a revisão de lâminas e seleção dos blocos representativos por patologista experimentado (Prof. Fernando Augusto Soares) e as técnicas de secção do material, processamento imunoistoquímico e confecção final das lâminas foram esmeradas e leitura do material no aparelho Aperio se deu por pessoal experimentado e colaborativo.

Os resultados aqui encontrados corroboram os achados do estudo da Dissertação de Souza Neto (2008), nesta instituição, que empregou o mesmo marcador, porém apenas em áreas de TMA intratumoral, sem avaliar as regiões de tecido normal, carcinoma *in situ* e de transição epitélio mesênquima e com um “cut off” inferior de 5%. Do mesmo modo, seu estudo dos níveis de expressão desta ciclina não influenciaram desfechos neoplásicos de interesse (morte, morte específica ou metástase linfonodal) tampouco se correlacionaram com fatores clínico patológicos adversos.

Acreditávamos que as regiões peritumorais, as áreas de transição entre tecido benigno e maligno, além de áreas de carcinoma *in situ*

pudessem expressar diferentemente este marcador e influenciar a evolução dos pacientes. Como recentemente em várias neoplasia sólidas o estudo da TEM tem mostrado valor prognóstico importante e recente estudo nesta instituição (SOUZA 2011), com o marcadores caderina E e vimentina. Decidimos por realizar ente novo estudo, avaliando se a expressão em diversas áreas pudessem trazer informações importantes sobre a expressão da ciclina D1.

Para isso a decisão de empregarmos secções tradicionais foi fundamental, assim pudemos ter numa mesma lâmina amostras destas diversas regiões tumorais e peritumorais.

Análise de tecidos peritumorais não neoplásico nos pareceu interessante, uma vez que o CaPe é doença cuja gênese é fortemente influenciada por agressões do meio externo. Assim não sabemos se as regiões peritumorais, embora com fenótipo “normal”, pudessem já apresentar expressão de ciclinas similar ao do CaPe.

Avaliar prepúcios de RNs, mostrou alternativa interessante, uma vez que esse prepúcios não sofreram praticamente influências do meio externo. Em nosso banco dispomos ainda de amostras de prepúcios de crianças pré-púberes submetidas a postectomia devido a fimose (portanto expostas a dermatite amoniacal e ao processos inflamatórios inerentes à fimose), sem contudo se exporem aos contatos sexuais. Temos ainda amostras de homens adultos jovens e adolescente também submetidos a postectomia por fimose. Estes sem dúvida têm os mesmos fatores agressores dos pré-púberes, porém por muito mais tempo, mas também se expuseram às

agressões decorrentes da ação sexual, tais como: micro traumas, escoriações, infecções virais, bacterianas, exposições a secreções de parceiros, etc.

Futuramente teremos disponível a expressão da ciclina nestas diferentes faixas etárias do prepúcio humano. Todavia devemos reforçar que não revelam um aspecto evolutivo da expressão dos marcadores, uma vez que não são tecidos do mesmos pacientes avaliados no decorrer do tempo.

Frente ao estudo inicial e o de nosso achadas, nos parece que a ciclina D1 não seja um biomarcador com grande valor prognóstico nesta neoplasia, desencorajando-nos a futuros estudos com o mesmo no carcinoma peniano.

Todavia, é sabido que inúmeros eventos biomoleculares, proteômicos ou genômicos e influências epigenéticas podem influenciar a hipo ou a hiperexpressão de um determinado marcador imunoistoquímico. A expressão imunoistoquímica nada mais é do que o resultado destas interações. Deste modo, a comprovação e validação de achados imunoistoquímicos poderiam ser realizadas com emprego de metodologias não sujeitas às variáveis acima listadas, como por exemplo: pelas técnicas de "Real Time Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR), ou pela Transcriptase reversa, Western Blot, sequenciamento genético, além de diversas técnicas de hibridização genômica e estudos de micro-RNAs, para citar algumas dentre tantas possibilidades. Muitos destes métodos poderiam ser melhor realizados em tecido fresco congelado em banco de tecidos, junto a alíquotas de sangue periférico.

Muitos destes estudos já estão em andamento com emprego de material biológico disponível em nosso banco de tecidos, através de um Estudo Temático de Câncer de Pênis desta instituição com fomentos de instituições como a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).

Apesar de possível, frente a dois estudo imunoistoquímicos revelando que a Ciclina D1 não se apresenta como importante marcado no Câncer de pênis, acreditamos que seria mais adequado investigar outros marcadores empregando tais possibilidades.

5.3 CICLINA D1 E FRONTE DE INVASÃO TUMORAL

O processo de carcinogênese é dividido em três etapas básicas: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, a célula acumula gradativas alterações no seu material genético e ao mesmo tempo sofre ação de agentes promotores que induzem a proliferação celular da célula mutada promovendo a sua expansão clonal (promoção). A terceira etapa diz respeito à capacidade do clone celular invadir e metastatizar.

Recentes estudos têm sido realizados com relação à progressão tumoral. Em tese de doutorado de SOUZA em 2011, foi avaliada a expressão da Ecad e Vimentina no FIT e no CdT em estudo da transição epitélio mesênquima. Observaram que houve perda da expressão da Ecad com maior frequência no FIT e estava associada com os fatores de mau prognósticos como: indiferenciação tumoral, padrão infiltrativo, metástase

linfonodal, invasão perineural e angiolinfática. Apresentou também associação com pior sobrevida global e câncer específica. Acreditamos que o estudo do ciclo celular no FIT é importante pois é onde acontece o processo de TEM contribuindo para a progressão do tumor.

Estudo em adenocarcinoma de cólon bem diferenciado evidenciou que há aumento da expressão da Ciclina D1 no fronte de invasão. No entanto, não foi constatado aumento da proliferação celular nessa região. Em contrapartida, no centro do tumor, observaram aumento da proliferação celular e baixa expressão da Ciclina D1. Em estudos de outros tumores, puderam constatar também que em 40% dos tumores há diminuição da expressão de p16^{INK4A} no centro do tumor com aumento da sua expressão no fronte tumoral (JUNG et al. 2001).

Não existem estudos que avaliem a expressão da Ciclina D1 no FIT em CaPe. Estudos prévios com a Ciclina D1 em CaPe (PAPADOPOULOS et al. 2007; SOUZA NETO 2008; GUNIA et al. 2012b) não avaliaram o FIT mesmo porque nos dois últimos, a técnica utilizada foi a de TMA, o que acreditamos não ser a forma adequada de avaliar regiões específicas da invasão tumoral. O estudo de PAPADOPOULOS et al. (2007) foi limitado pelo número de casos pequeno de câncer peniano e estudaram em conjunto lesões pré malignas. Também não foi objeto de estudo a análise de sobrevida relacionada ao marcador, ao contrário de nossa série.

O ponto de corte para a definição da positividade para a Ciclina D1 é difícil pois não são muitos os trabalhos em CaPe e a maioria dos trabalhos realizados para outros tipos de tumores não utilizou um método

automatizado como o utilizado por nós. Consideramos positivos, no presente estudo, o ponto de corte de 10% para definirmos os casos. Após a verificação da reatividade das nossas reações, foi observada que a porcentagem média de positividade para Ciclina D1 ficou entre 6,87 e 21,80. Achamos adequada a adoção da nota de corte em 10% em vez de uma positividade mais baixa. Além do mais, outros estudos em tumores de outros órgãos consideraram esse limite como o adequado para seus estudos (CHEN et al. 2005). Ainda assim, testamos outros níveis como 5% e alguns quartis e tercis, sem significância.

Ao analisarmos a expressão da Ciclina D1 no CaPe, não encontramos associação com os dados clínicos como idade, raça ou antecedente de doença venérea. Quando comparamos a expressão da Ciclina D1 com os fatores patológicos, encontramos associação com o grau histológico do tumor com a expressão no FIT, apenas ($p=0,026$). Entretanto, verificamos que tumores de baixo grau no FIT têm predominância de expressão negativa da Ciclina D1 (79,5%), sendo menor nos casos de graus intermediários (52%) e alto (60,3%). Notamos um leve predomínio de baixa expressão em comparação a alta expressão. Talvez, lesões de baixo grau têm menor proliferação celular, mantenham maior integridade das estruturas que mantém a adesividade celular e apresentam menor descamação. Por apresentarem redução do ciclo celular tenham apresentado predominância de expressão negativa. Outra possibilidade é o acaso, em razão do tamanho de nossa amostra e pelo fato de que a expressão desta ciclina não se associou com nenhuma das inúmeras variáveis testadas. Houve uma

tendência na associação com a expressão no CdT ($p=0,062$). Em estudo prévio, realizado em TMA nesta instituição, foi encontrado o mesmo dado referente ao grau histológico, mas foi visto também associação com a infiltração de corpos cavernosos, embolização venosa e infiltração da uretra (SOUZA NETO 2008). Em adenocarcinoma ou CEC de esôfago foi observado que tumores bem e moderadamente diferenciados apresentavam expressão maior do que os indiferenciados (ARBER et al. 1999).

Por acreditarmos que na carcinogênese teríamos uma replicação celular intensa, principalmente no fronte de invasão tumoral, surpreendeu-nos a positividade média maior nos prepúcios de recém-nascidos do que no tumor. Não existem estudos, até o momento, que avaliem a morfologia ou a reação de marcadores biomoleculares no prepúcio de recém-nascidos. Estes, foram analisados na expectativa de podermos utilizá-los como possíveis controles negativos na comparação com tumores de pênis.

No nosso estudo, não houve aumento da expressão da Ciclina D1 no fronte de invasão. No entanto, acreditamos que haja necessidade de estudo dos outros marcadores desta via do ciclo celular para ser que seja analisado na sua totalidade. É difícil pensarmos no ciclo celular (que é dinâmico e sofre atuação de tantos outros fatores) levando em conta apenas a Ciclina D1. Por fazer parte de um aparato maior, estudos já demonstraram a importância da correlação do complexo p16/Ciclina D1/Rb (LUKAS et al. 1995). No carcinoma escamoso de cabeça e pescoço observou-se amplificação da Ciclina D1 por FISH (hibridização fluorescente in situ) em 36% dos tumores primários. E em 91% dos casos houve alguma alteração da via p16/Ciclina

D1/Rb e embora a amplificação da Ciclina D1 ocorra em associação com a diminuição de p16, alterações de p16 ou Rb aparentemente são exclusivas (OKAMI et al. 1999). Outro estudo em CEC de língua observou que a interação Ciclina D1/GSK3b foi melhor preditor de mortalidade do que a avaliação da ciclina isoladamente (GOTO et al. 2002).

Corroborando a ideia de que a expressão da Ciclina D1 não deve ser analisada de forma isolada, um grupo alemão publicou dois artigos recentemente demonstrando relação da baixa expressão de p16^{INK4} com a diminuição da sobrevida câncer específica em 10 anos (GUNIA et al. 2012a). O mesmo grupo com casuística semelhante com 110 casos, não conseguiu associar a expressão da Ciclina D1 com a sobrevida câncer específica (GUNIA et al. 2012b).

Em nosso grupo, GUIMARÃES et al. (2007) investigaram o Ki-67, um marcador de proliferação celular, usualmente expresso em todas as fases do ciclo celular (exceto em G0) em CaPe e curiosamente verificou-se uma correlação invertida com prognóstico, na qual a hiperexpressão se associou a evolução mais favorável e menos metástases linfonodais.

5.4 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASE LINFONODAL

Os critérios patológicos associados à metástase linfonodal e à sobrevida foram estudados em outras ocasiões e houve a identificação da invasão vascular e linfática como fatores importantes para metástase linfonodal (LOPES et al. 1996). Além deles, o tipo histológico, grau histológico, a espessura do tumor e nível de invasão também já demonstraram importância. Marcadores biomoleculares têm sido utilizados na tentativa de associação tanto com metástase linfonodal quanto na tentativa de acharmos algum marcador como prognóstico da doença.

Em nosso estudo, não encontramos um risco aumentado para metástase linfonodal associada à expressão da Ciclina D1 nas diferentes regiões no CaPe (CdT, FIT ou CIS).

Na análise univariada, o único fator de risco encontrado foi o grau histológico e esse dado permaneceu na análise multivariada com um RR de 2,5 para aqueles pacientes com grau histológico intermediário ou alto, corroborando os estudos publicados PAPADOPOULOS et al. (2007) e (VELAZQUEZ et al. 2008) que encontraram uma tendência de associação entre o grau histológico e a positividade da Ciclina D1 ($p=0,07$).

5.5 ANÁLISE DA SOBREVIDA

5.5.1 Sobrevida global

A taxa de sobrevida global em 10 anos foi de 42,0%. Dentre as variáveis clínicas e demográficas a idade ($p=0,028$) e o estadiamento clínico linfonodal ($p=0,026$) mostraram importância na análise univariada. As variáveis patológicas relacionadas estão o grau histológico ($p=0,001$), invasão vascular ($p<0,001$) e invasão perineural ($p<0,001$). Na análise multivariada, a única variável que demonstrou ser fator de risco independente para óbito foi a invasão perineural (RR=6,412; IC 95% [1,785-23,035]).

A imunorreatividade para Ciclina D1 não mostrou ser um fator de risco nem no CdT, FIT, PNN nem no CIS peritumoral. Esses dados concordam com recentes publicações de CUBILLA et al. (2008) e AYALA et al. (2009), inclusive com dados de nossa instituição onde a invasão perineural foi fator independente para menores taxas de sobrevida e maior risco de metástases linfonodais. A invasão vascular já foi demonstrada como evento adverso por LOPES et al. 1996 e a ocorrência de graus histológicos se associa a menor sobrevida em inúmeras séries. A idade, obviamente quanto maior representa maior risco para mortalidade global.

5.5.2 Sobrevida câncer específica

A taxa de sobrevida câncer específica em 10 anos foi de 73,8%. Dentre as variáveis clínicas e demográficas, aquelas que influenciaram

significativamente a sobrevida câncer específica foi o estado civil ($p=0,014$) e o estadiamento clínico linfonodal ($p=0,007$).

O estadiamento linfonodal clínico (cN) é um acurado preditor de metástases linfonodais (MCDUGAL et al. 1986; LOPES et al. 1996; ORNELLAS et al. 2008). Pacientes com linfonodomegalia unilateral (cN1) apresentaram pior prognóstico do que aqueles que apresentavam bilateral (cN2), acreditando-se que normalmente quando a doença aparentemente está distribuída em ambos os lados, trata-se de infecção, e não de neoplasia. Dizer que os pacientes solteiros apresentaram sobrevida pior, pode ser resultado do acaso, ou pode ser que o fato de não apresentarem uma estrutura familiar para incentivar o seu diagnóstico e tratamento, fez com que tivessem uma evolução desfavorável.

Dentre as variáveis patológicas, aquelas que apresentaram influência na SCE foram: metástase linfonodal ($p=0,017$), grau histológico tumoral ($p<0,001$), invasão vascular ($p<0,001$) e invasão perineural ($P=0,001$). Não houve alteração da SCE com relação à expressão da Ciclina D1 em nenhuma das regiões estudadas.

Na análise multivariada, foram fatores de risco para óbito pelo CaPe apenas a invasão perineural ($RR=7,155$; IC 95% [1,824-28,071]).

Estes dados confirmam que a invasão perineural é um importante fator de risco no CaPe, tanto para sobrevida global quanto câncer específica. CUBILLA et al. (2008) já havia identificado tal fator como independente para sobrevida câncer específica, juntamente com metástase linfonodal, sugerindo outros estudos que corroborassem tal achado (AYALA et al.

2009). Pode ser que haja uma interação neoplasia-nervo e através dela, possam ocorrer metástases.

Acreditamos que a IPN tenha realmente importância quanto ao prognóstico do CaPe. E desta forma, assim como acreditam que no câncer de próstata devamos ser mais agressivos no tratamento destes pacientes quando submetidos à radioterapia (FENG et al. 2011), no CaPe também deveríamos agir da mesma forma, em vista da importância na sobrevida.

Em estudo a respeito de IPN em câncer de próstata, observaram um vantagem para crescimento em células nas regiões onde há invasão perineural e isso pode ocorrer devido a estímulo de fatores de crescimento (FROMONT et al. 2012). Pode ser que encontremos, da mesma forma, fatores que estimulem o crescimento celular no CaPe nessas áreas. E para confirmarmos essa alteração poderíamos checar se há aumento da proliferação celular (com o Ki-67 ou com a própria Ciclina D1 ou através de estudo genético), correlacionando com a sobrevida.

6 CONCLUSÕES

- A expressão da Ciclina D1 apresentou correlação estatisticamente significativa com a diferenciação tumoral. E esta, após análise uni e multivariada, foi o único fator de risco para metástase linfonodal.
- Não existe associação entre a expressão da Ciclina D1 no centro do tumor ou no frente de invasão tumoral com metástase linfonodal nem com sobrevida global ou câncer específica.
- A Ciclina D1 está mais expressa no prepúcio de recém-nascidos do que no câncer de pênis, tanto no frente de invasão tumoral quanto no centro do tumor.
- A invasão perineural foi o único fator de risco tanto na análise uni quanto multivariada para morte câncer específica ou global.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agami R, Bernards R. Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle. **Cancer Lett** 2002; 177:111-8.

Andrade JB. **Correlação clínico-patológica da expressão proteica do complexo CD44/ERM (ezrina/radixina/moesina) no carcinoma de pênis.** São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Arber N, Gammon MD, Hibshoosh H, et al. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. **Hum Pathol** 1999; 30:1087-92.

Ayala GE, Cubilla AL, Lopes A, et al. Perineural invasion (PNI) predicts mortality in penile squamous cell carcinoma. A long-term outcome study comparing clinico-pathologic features. **J Urol** 2009; 181:327.

Barros EN, Melo MCB. Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de Psicologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. **Rev SBPH** 2009; 12:99-111.

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.

Bissada NK, Morcos RR, el-Senoussi M. Post-circumcision carcinoma of the penis. I. Clinical aspects. **J Urol** 1986; 135:283-5.

Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ.. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol** 2009; 27:141-50.

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

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

Brumini R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-80**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1982.

Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. **Oncogene** 1993; 8:2127-33.

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

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

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

Campos RSM. **Avaliação do valor da expressão imuno-histoquímica da pan-caderina e metaloproteases da matriz extra-celular tipo 2 e tipo 9 como fatores preditivos do risco de metástases linfonodais em pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

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

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

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

Cubilla AL. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **World J Urol** 2008; 27:169-77.

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

da Fonseca AG, Rabelo GN, Vidal KS, de Sousa FJ. Glandectomy with preservation of corpora cavernosa in the treatment of penile carcinoma. **Int Braz J Urol** 2003; 29:437-40.

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.

Day PJ, Cleasby A, Tickle IJ, et al. Crystal structure of human CDK4 in complex with a d-type cyclin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:4166-70.

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

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

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

Feng FY, Qian Y, Stenmark MH, et al. Perineural invasion predicts increased recurrence, metastasis, and death from prostate cancer following treatment with dose-escalated radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 81:e361-7.

Ficarra, V, F Zattoni, W Artibani, A Fandella, G Martignoni, G Novara, T P Galetti, T Zambolin, and M W Kattan. Nomogram predictive of pathological inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175 (5): 1700-1705.

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.

Freitas-Rodrigues AF. **Estudo da resposta imune peritumoral em carcinoma de pênis**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

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

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

Fromont G, Godet J, Pires C, Yacoub M, Dore B, Irani J. Biological significance of perineural invasion (PNI) in prostate cancer. **Prostate** 2012; 72:542-8.

Gairdner D. The fate of the foreskin, a study of circumcision. **Br Med J** 1949; 2:1433-7.

Glass JM. Religious circumcision: a Jewish view. **BJU Int** 1999; 83(Suppl 1):17-21.

Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK. Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and end Results (SEER) program. **Oncologist** 2003; 8:541-52.

Goto H, Kawano K, Kobayashi I, Sakai H, Yanagisawa S. Expression of cyclin D1 and gsk-3beta and their predictive value of prognosis in squamous cell carcinomas of the tongue. **Oral Oncol** 2002; 38:549-56.

Graafland NM, Teertstra HJ, Besnard PA, van Boven HH, Horenblas S. Identification of high risk pathological node positive penile carcinoma: value of preoperative computerized tomography imaging. **J Urol** 2011; 185:881-7.

Guidoni LRM. **Imunoexpressão e valor prognóstico de CD9 no carcinoma epidermóide de pênis**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Guimarães GC. **Estudo de fatores prognósticos e da expressão imunohistoquímica de PCNA e MIB-1/Ki-67 em pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

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, Cunha IW, Soares FA, et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34; discussion 534.

Guimarães GC. **Análise de fatores prognósticos e da expressão imunoistoquímica da involucrina, e das proteínas da placa desmossômica: desmogleína, plakoglobina e desmoplakina através da técnica de "tissue microarray" em pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.** São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Gunia S, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. P16(ink4a) is a marker of good prognosis for primary invasive penile squamous cell carcinoma: A multi-institutional study. **J Urol** 2012a; 187:899-907.

Gunia S, Kakies C, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: P53 predicts poor prognosis. **J Clin Pathol** 2012b; 65:232-6.

Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. **Adv Cancer Res** 1996; 68:67-108.

Heideman DAM, Bleeker MCG, Ahmed HU, et al. Molecular biology of penile cancer. In: Muneer A, Arya M, Horenblas S. editors. **Textbook of penile cancer.** New York: Springer; 2012. p.13-25.

Hernandez BY, Shvetsov YB, Goodman MT, et al. Reduced clearance of penile human papillomavirus infection in uncircumcised men. **J Infect Dis** 2010; 201:1340-3.

Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:709-13.

Holly EA, Palefsky JM. Factors related to risk of penile cancer: New evidence from a study in the pacific northwest. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:2-4.

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

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

Hutcheson JC. Male neonatal circumcision: Indications, controversies and complications. **Urol Clin North Am** 2004; 31:461-7.

Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. **Cancer Res** 1992; 52:2980-3.

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

Jung A, Schrauder M, Oswald U, et al. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16ink4a and is a region of low proliferation. **Am J Pathol** 2001; 159:1613-7.

Kahlert C, Lahes S, Radhakrishnan P, et al. Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. **Clin Cancer Res** 2011; 17:7654-63.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119:1420-8.

Kayaba H, Tamura H, Kitajima S, Fujiwara Y, Kato T, Kato T. Analysis of shape and retractability of the prepuce in 603 Japanese boys. **J Urol** 1996; 156:1813-5.

Kim AL, Gautier J, Bickers DR, Athar M. Reduced cyclin D1 ubiquitination in UVB-induced murine squamous cell carcinomas. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 298:377-82.

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

Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. **Oncogene** 2006; 25:1620-8.

Korkes F, Neves-Neto OC, Wroclawski ML, Tobias-Machado M, Pompeo AC, Wroclawski ER. Parachute technique for partial penectomy. **Int Braz J Urol** 2010; 36:198-201.

Kroon BK, Horenblas S, Nieweg OE. Contemporary management of penile squamous cell carcinoma. **J Surg Oncol** 2005a; 89:43-50.

Kroon BK, Horenblas S, Lont AP, Tanis PJ, Gallee MP, Nieweg OE. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. **J Urol** 2005b; 173:816-9.

Larke NL, Thomas SL, dos Santos Silva I, Weiss HA. Male circumcision and penile cancer: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Causes Control** 2011; 22:1097-110.

Lazzereschi D, Sambuco L, Carnovale Scalzo C, et al. Cyclin D1 and cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinomas. **Int J Cancer** 1998; 76:806-11.

Liu Z, Kakudo K, Bai Y, et al. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma, a novel predictor for lymph node metastasis; possible morphological indicator of epithelial mesenchymal transition. **J Clin Pathol** 2011; 64:325-9.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Cancer de pênis. **Âmbito Hosp** 1994; 58:5-13.

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

Lukas J, Aagaard L, Strauss M, Bartek J. Oncogenic aberrations of p16ink4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. **Cancer Res** 1995; 55:4818-23.

Madsen BS, van den Brule AJ, Jensen HL, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for squamous cell carcinoma of the penis--population-based case-control study in Denmark. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:2683-91.

Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. **Cell** 1991; 65:701-13.

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

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

Meuli M, Briner J, Hanimann B, Sacher P. Lichen sclerosus et atrophicus causing phimosis in boys: A prospective study with 5-year followup after complete circumcision. **J Urol** 1994; 152:987-9.

Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. **Cancer Res** 1995; 55:975-8.

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

Morris BJ, Gray RH, Castellsague X, et al. The strong protective effect of circumcision against cancer of the penis. **Adv Urol** 2011; 2011:812368.

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

Okami K, Reed AL, Cairns P, et al. Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncogene** 1999; 18:3541-5.

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

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

Pascual A, Pariente M, Godínez JM, et al. High prevalence of human papillomavirus 16 in penile carcinoma. **Histol Histopathol** 2007; 22:177-83.

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

Petera J, Sirák I, Kašaová L, et al. High-dose rate brachytherapy in the treatment of penile carcinoma--first experience. **Brachytherapy** 2011; 10:136-40.

Pettaway CA, Lynch DF, Davis JW. Tumors of the penis. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. **Campbell-Walsh urology**. 9th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p.959-992.

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

Porter WM, Francis N, Hawkins D, Dinneen M, Bunker CB. Penile intraepithelial neoplasia: clinical spectrum and treatment of 35 cases. **Br J Dermatol** 2002; 147:1159-65.

Pow-Sang MR, Ferreira U, Pow-Sang JM, Nardi AC, Destefano V. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology** 2010; 76(Suppl 1):S2-6.

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

Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. **Mol Cell Biol** 1994; 14:1669-79.

Rizvi SA, Naqvi SA, Hussain M, Hasan AS. Religious circumcision: a Muslim view. **BJU Int** 1999; 83(Suppl 1):13-6.

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

Roy PG, Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. **Breast** 2006; 15:718-27.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol** 2000; 36:256-63.

Sethi S, Macoska J, Chen W, Sarkar FH. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. **Am J Transl Res** 2010; 3:90-9.

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

Sobin LH, Wittekind CH. **TNM: Classificação de tumores malignos.** 6^a ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Pênis (CID-O C60); p.187-9.

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.

Souza MJL. **Avaliação da transição epitélio-mesênquima no carcinoma de pênis.** São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

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

Starostina NG, Kipreos ET. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. **Trends Cell Biol** 2012; 22:33-41.

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

Tabatabaei S, Harisinghani M, McDougal WS. Regional lymph node staging using lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10 in patients with penile cancer. **J Urol** 2005; 174:923-7; discussion 927.

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

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

Thuret R, Sun M, Abdollah F, et al. Tumor grade improves the prognostic ability of American Joint Committee on Cancer stage in patients with penile carcinoma. **J Urol** 2011; 185:501-7.

Tobian AA, Kigozi G, Gravitt PE, et al. Human papillomavirus incidence and clearance among HIV-positive and HIV-negative men in Rakai, Uganda. **AIDS** 2012 Mar 21. [Epub ahead of print].

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

Tobias-Machado M, Tavares A, Ornellas AA, Molina WR Jr, Juliano RV, Wroclawski ER. Video endoscopic inguinal lymphadenectomy: a new minimally invasive procedure for radical management of inguinal nodes in patients with penile squamous cell carcinoma. **J Urol** 2007; 177:953-7; discussion 958.

Tobias-Machado M, Correa WF, Reis LO, et al. Single-site video endoscopic inguinal lymphadenectomy: Initial report. **J Endourol** 2011; 25:607-10.

Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: Results of a population-based case-control study in Los Angeles County (United States). **Cancer Causes Control** 2001; 12:267-77.

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

Wattleworth R. Human papillomavirus infection and the links to penile and cervical cancer. **J Am Osteopath Assoc** 2011; 111(Suppl 2):S3-10.

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

Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. Human D-type cyclin. **Cell** 1991; 65:691-9.

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

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

Zequi SC, Guimarães GC, da Fonseca FP, et al. Sex with animals (SWA): Behavioral characteristics and possible association with penile cancer: a multicenter study. **J Sex Med** 2011 Oct 24. [Epub ahead of print]

Zhu Y, Ye DW, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhang HL. New N staging system of penile cancer provides a better reflection of prognosis. **J Urol** 2011; 186:518-23.

Anexo 1 - Classificação da retractibilidade do prepúcio (KAYABA et al. 1996)



I



II



III



IV



V

Anexo 2 - 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 in situ
Ta - Tumor verrucoso não invasivo
T1a - Tumor invade tecido conectivo subepitelial sem invasão vascular e é bem diferenciado (ex.: tumores grau 1 ou 2)
T1b - Tumor invade tecido conectivo subepitelial com invasão vascular ou é pouco diferenciado (ex.: tumores de grau 3 ou 4)
T2 - Tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso
T3 - Tumor invade uretra 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 a distância
M1 - Com metástase a distância
G - Grau histopatológico
Gx - grau histopatológico não pode ser avaliado
G1 - bem diferenciado
G2 - moderadamente diferenciado
G3-4 - pobre diferenciação/indiferenciado

Fonte: (EDGE et al. 2010)

Anexo 3 - Estádios separados conforme a Classificação da AJCC

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

Fonte: EDGE et al. (2010)

Anexo 4 - Estadiamento do CaPe pelo *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER)

Estadio I
tumor localizado
Estadio II
metástase loco-regional
Estadio III
metástase à distância

Anexo 5 - Ficha de Levantamento de Dados em Câncer de Pênis

Hospital: _____ Médico: _____

Nº do pront. No Hosp. De origem: _____ Data: ____/____/____

Dados Gerais

Nº do Array.....|_|_|_|_|

Nº do AP.....|_|_|_|_| Data do AP: ____/____/____

RG.....|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Revisto: (m) microfilme (p) prontuário|_|

Idade a Admissão (anos).....|_|_| Data da Admissão: ____/____/____

Data de Nascimento: ____/____/____

Cidade/UF: _____ Telefone: _____

Dados Epidemiológicos

Estado Civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) Divorciado (5) Outros (9) Ign.....|_|

Raça : (1) Branca (2) Amarela (3) Negro (4) Parda (9) Ign.....|_|

Orientação sexual: (1) Heterossexual (2) Homossexual (3) Bissexual (8) Não avaliável.....|_|

Hábitos sexuais: (1) Parceira(o) única(o) (2) Múltiplas(os) parceiras(os)
(8) Não Avaliável.....|_|

Idade do primeiro coito.....|_|_|

Antecedentes Venéreos: (0) Não (1) Sim (9) Ign.....|_|

Se Sim, qual(s)?: (1) Gonorréia (2) Condiloma Acuminado (3) Uretrites (4) Lues (5) HIV+/AIDS (6) Outras _____ (9) Ign.....|_|

Sinais / Sintomas: (1) Ferida (2) Dor (3) Inflamação (4) Disúria (5) Prurido
(6) Outros (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|

Tempo de Evolução (meses): (se ignorado 9999).....|_|_|

Doenças prévias relacionadas: (0) Não (1) Balanite Xerótica Obliterante (2) Lúquen escleroso (3) E. Queyrat (4) D. Bowen (5) Papulose Bowenóide (6) Balanopostite crônica (7) Condiloma (8) Fimose (88) Não se aplica (9) Ign.....|_|

Postectomia: (0) Não (1) Não relacionada (2) Relacionada (3) Ao nascimento (4) Infância/Adolesc. (5) Vida Adulta (6) Recente (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|

Situação a 1ª consulta: (1) Biopsiado (2) Amputado (3) Esvaziado (4) Intacto (9) Ign.....|_|

Tumor (AJCC 6): (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx.....|_|

Linfonodos (AJCC 6): (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (9) Nx.....|_|

Metástases (AJCC 6): (0) M0 (1) M1 (9) Mx.....|_|

Estadiamento Clínico (AJCC 6): (0) EC0 (1) ECI (2) ECII (3) ECIII (4) EC IV (9) Ign.....|_|

Classificação de Jackson: (1) St I (2) St II (3) St III (4) St IV (9) Ign.....|_|

Tumor (AJCC 7): (0) Tis (1) Ta (2) T1a (3) T1b (4) T2 (5) T3 (6) T4 (9) Tx.....|_|

Linfonodos (AJCC 7): (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (9) Nx.....|_|

Metástases (AJCC 7): (0) M0 (1) M1 (9) Mx.....|_|

Estadiamento Clínico (AJCC 7): (0) EC0 (1) ECI (2) ECII (3) ECIIIa (4) ECIIIb (5) EC IV..|_|

Cirurgia: (1) Amp. Parcial (2) Amp. Total (3) Exérese (4) Postectomia

(5) AIIA – Inter-íleoabdominal (6) Emasculação (9) ign.....|_|

Data da amputação / ressecção....._/___/___

Complicações relacionadas a cirurgia: (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) Estenose (4) hemorragia (9) Ign.....|_|

Tipo de espécime: (1) Biópsia Incisional (2) Biópsia excisional (3) Penectomia Parcial

(4) Penectomia Total (5) Circuncisão (6) Recorrência em coto (7) Linfonodo isolado (8) Metástase.....|_|

Localização do tumor: (1) Glândula (2) Prepúcio (3) Sulco Balanoprepucial (SBP) (4) Glândula e SBP (predominantemente glândula, >70%) (5) Prepúcio e sulco SBP (predominantemente prepúcio, >70%) (6) Pele (7) Uretra Peniana (8) Múltiplos sítios Quais? _____

(9) Ign.....|_|

Padrão de Crescimento: (1) Crescimento superficial (2) Crescimento Vertical

(3) Verruciforme (4) Mais de um padrão: _____ (9)

Ign.....|_|

Lesões associadas: (1) Placa (2) Pápula (3) Nódulo (4) Úlcera (5) Outras (9)

Ign.....|_|

Macroscopia:

Tamanho do da peça cirúrgica do pênis (cm).....|_|

Tamanho do Tumor (cm)|_|

Distância do tumor à margem (cm).....|_|

Localização (macroscopia): (1) Glândula (2) Prepúcio (3) Sulco bálano – prepucial

(4) Corpo (5) Uretra (6) Tumor multicêntrico (7) Escroto (8) Não avaliável (9)

Recidiva inguinal – interílio (10) Tu em coto recidiva (99)

Ign.....|_|

Invasão (macroscopia): (0) Não tem (1) Corpo esponjoso (2) Corpo cavernoso (3)

Uretra (4) Osso (5) Raiz pênis (6) Pele (7) Escroto (8) Não avaliável (9)

Ign.....|_|

Histologia

Histologia: (1) CEC (2) Warty (3) Papilar (4) Giant condiloma (5) Sarcomatoide (6)

Sendo glandular (7) Cuniculatum (8) Basaloide (9) Verrucoso (10) Warty –

basaloide (11) Uretra (12) Pseudo hiperplasia (13) Adeno – esquamoso (14) Mixed

(15) Anaplásico (16) Verrucoso Invasivo (17) Warty invasivo (18) Outros (99)

Ign.....|_|

Bordas : (1) Pushing (2) Infiltrating (8) Nao avaliável (9)

Ign.....|_|

Margem: (0) Negativa (1) Positiva (8) Não avaliável (9)

Ign.....|_|

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

(9) Ign.....|_|

Local anatômico-AP: (1) LP (2) CS (3) CC (4) DT (5) SK (6) A1B

(8) Não se aplica (9) Ign.....|_|

Corpo esponjoso-AP: (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliável (9)

Ign.....|_|

Corpo cavernoso-AP: (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliável (9)

Ign.....|_|

Glande: (0) Negativo (1) Lâmina própria (2) Corpus spongiosum (3) Corpora

Cavernosa (incluído túnica albigínea) (9) Ign.....|_|

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

Sulco balanoprepucial: (0) Negativo (1) Lâmina Própria (2) Dartos (3) Fáscia de

Bucks (9) ign.....|_|

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

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

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

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

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

Infiltração de órgãos adjacentes: (0) Não (1) Presente (8) Não avaliável (9)

Ign.....|_|

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

Hiperplasia escamosa (Hiperesc): (0) Não tem (1) Tem (8) Não avaliado (9)

Ign.....|_|

Tipo Hiperplasia escamosa (Thiperesc): (0) Flat (1) Papilar (2)

Pseudoepiteliomatosa

(3) Verrucosa (4) Outras (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|

SIL: (0) Não tem (1) Baixo grau (2) Alto grau (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|

Tipo de SIL (Tsil): (0) Warty (1) Escamoso (2) Basalóide (3) Warty-basalóide

(8) Não avaliado (9) Ign.....|_|

Líquen Escleroso (LS): (0) Negativo (1) Positivo (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|

Tipo de Líquen Escleroso (TLS): (0) Típico (1) Atípico (8) Não avaliado (9)

Ign.....|_|

Uretral: (0) Sil negativo (1) Sil positivo (8) Não avaliado (9) Ign.....|_|

Esvaziamento Ganglionar

Tipo esvaziamento ganglionar: (0) Não (1) Inguinal (2) Inguino-iliaco (9) Ign....|_|

Intenção do esvaziamento: (1) Principio (2) Necessidade (8) Não se aplica (9)

Ign.....|_|

Lateralidade do esvaziamento: (1) Unilateral (2) Bilateral (8) Não se aplica (9)

Ign.....|_|

Complicações relacionadas esvaziamento: (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência

(3) Hematoma (4) Necrose (5) Linfedema (6) Ruptura de vasos (8) Não se aplica

(9) Ign.....|_|

Total de Linfonodos examinados (se Ignorado 9999).....|_|_|

Total de Linfonodos positivos.....|_|_|

Lateralidade linfonodos positivos: (1) Unilat. (2) Bilateral (8) Não se aplica (9)

Ign.....|_|

Cadeia Positiva: (1) Inguinal (2) Inguinal+Ilíaco (3) Ilíaco (8) Não se aplica (9)

Ign.....|_|

Adjuvancia:

(0) Não, (1) quimioterapia, (2) Radioterapia, (8) não se aplica (9) Ign.....|_|

Recidiva / Seguimento

Data da recidiva....._/___/___

Local da recidiva: (0) Não (1) Coto (2) Regional (3) Pulmões (4) Ossos (5) Fígado

(6) Outros (8) Não se aplica (9) Ign.....|_|

Tratamento da recorrência; (0) Não (1) Amputação (2) Linfadenectomia (3) Rxt (4) Qt (5) Cirurgia meta (6) Outros (8) Não se aplica (9) Ign.....|__|

Data do ultimo seguimento.....__/_/____

Situação no seguimento: (1) Vivo s/ doença (2) Vivo com doença (3) Óbito por Câncer

(4) Óbito por outra causa (5) Perdido de vista (9) Ign.....|__|

Historia Sexual e Zoofilia

Número de parceiras sexuais: (0) zero (1) menos de 5 (2) 5 a10 (3) 10 a15 (4) 15 a 20 (5) mais de 20 (8) Não se aplica (9) Ign.....|__|

Relações sexuais com prostitutas: (0) não (1) sim.....|__|

Relações sexuais com animais: (0) não (1) sim.....|__|

Qual animal (um ou mais): (1) égua (2) mula (3) jegue/jumento (4) caprino (5) ovino (6) bezerro (7) bovino adulto (8) bubalino bezerro (9) bubalino adulto (10) canino (11) galináceo (12) pato (13) Outros _____ (88) Não se aplica (99) Ign.....|__|

Tempo de exposição: Idade inicial: _____|__|

Tempo de exposição: Idade final: _____|__|

Frequência: (0) diária (1) dias alternados (2) 2x semana (3) 3x semana ou mais (4) semanal (5) quinzenal (6) mensal (7) bimensal (8) trimestral (9) semestral (10) anual (11) uma única vez (10) Outra: _____ (88) Não se aplica (99) Ign.....|__|

Prática: (1) Individual (2) Grupo (8) Não se aplica.....|__|