

**ANÁLISE DE FATORES PROGNÓSTICOS E DA EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA DA INVOLUCRINA, E DAS
PROTEÍNAS DA PLACA DESMOSSÔMICA: DESMOGLEINA,
PLAKOGLOBINA E DESMOPLAKINA ATRAVÉS DA
TÉCNICA DE “TISSUE MICROARRAY” EM PACIENTES
PORTADORES DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DO PÊNIS**

GUSTAVO CARDOSO GUIMARÃES

**Tese apresentada à Fundação Antonio Prudente
para a obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Guimarães, Gustavo Cardoso

Análise de fatores prognósticos e da expressão imunoistoquímica da involucrina, e das proteínas da placa desmossômica: desmogleinas, plakoglobina e desmoplakina através da técnica de “tissue microarray” em pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis / Gustavo Cardoso
Guimarães - São Paulo, 2010.

174p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1. CÂNCER DO PÊNIS. 2. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 3. PLACA DESMOSSÔMICA. 4. INVOLUCRINA. 5. METÁSTASE LINFÁTICA. 6. PROGNÓSTICO

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos **Eduardo** e **Isadora**, presentes de Deus e alegrias da minha vida, motivo de tudo que sou e faço, inspiração e incentivo para a vida.

A **Andréa**, minha esposa, companheira sincera e cúmplice, pelo incentivo, paciência, dedicação, e carinho indispensáveis para todos os momentos da vida.

Aos meus pais, **Edival** e **Anna**, pelo exemplo de vida, carinho, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, **Beatriz** e **Gabriel**, pela amizade e amor que nos une.

Ao Hospital do A C Camargo e seus pacientes, responsáveis direto pela minha formação e motivo para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A. C. Camargo, meu orientador e grande incentivador, pela confiança, cuidadosa participação, e seu exemplo.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, meu co-orientador, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica, pela eficiência, dedicação, disponibilidade e acima de tudo pela Amizade.

A Sra. Suely Francisco, bibliotecária do Hospital do Câncer, pelas sugestões, orientações e revisão desta tese além do carinho e carisma que exalta as suas qualidades.

As Sra. Francyne Polen Gomes de Lima, funcionária da biblioteca do Hospital do Câncer, pela presença constante, eficiência e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A Sra. Hirde Contesini, pela colaboração, dedicação e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) e pelo carisma marcante em nossa convivência.

Ao Dr. Stênio de Cássio Zequi, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica, pela amizade e companheirismo diário nas tarefas do dia-a-dia.

Ao Dr. Wilson Bachega Jr., amigo e colega no Departamento de cirurgia Pélvica, pela ajuda nas atividades diárias e constante apoio.

Ao Dr. Francisco Paulo da Fonseca, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica, pelos constantes ensinamentos e pelo incontestável exemplo de dedicação.

Ao Dr. Salim Zequi Garcia, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica, pelo exemplo profissional e de vida.

Ao Dr. Benedito Mauro Rossi, pela amizade, companheirismo, incentivo, orientações e ensinamentos que me ajudam na vida e neste trabalho.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Ferreira, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica pelas orientações, sugestões, e amizade de irmão.

Ao Dr. Samuel Aguiar Junior, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica e amigo, sempre presente em todos os momentos.

A Dra Isabela Werneck pela ajuda com a anatomia patológica e disponibilidade em ajudar.

Aos Drs. Glauco Baiocchi; Alexander Bressan e Lillian Kumagay e Carlos Fallopa, amigos sempre disponíveis para ajudar-me em todos os momentos e motivos de satisfação.

Ao Dr. Rodrigo Madeira Campos e Dr. Carlos Alberto Ricetto Sacomani, que a convivência diária tem me trazido grandes ensinamentos, além de ser muito prazerosa.

Aos companheiros do Departamento de Cirurgia Pélvica: Drs. Wilson T. Nakagawa, Wu Tu Chung, Luciola Alves Assunção, Suely Nakagawa, pela amizade, confiança e apoio diários.

A Fernando, meu sogro e Zenaide, minha sogra, pelo carinho, compreensão e estarem sempre presentes e prontos a ajudar-nos.

Aos inúmeros residentes, amigos e colegas de trabalhos que de várias formas, direta ou indiretamente estão presentes no dia-a-dia, pelo apoio e amizade, indispensáveis para as tarefas diárias e a realização deste trabalho e que pelo espaço não foram citados nominalmente.

RESUMO

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].

Introdução: O tratamento para o câncer invasivo do pênis baseia-se no tratamento do tumor primário, geralmente com amputação e na linfadenectomia regional, tratamentos que apresentam alto índice de morbidade. A presença de metástase linfonodal constitui o mais importante fator prognóstico identificado e sua avaliação por métodos clínicos e laboratoriais são falhos. **Objetivos:** O presente estudo visa identificar os fatores prognósticos do tumor primário e a importância das Proteínas da Placa Desmossômicas: Desmogleína, Plakoglobina e Desmoplakina e da Involucrina e a relação destas com as variáveis clínicas, demográficas e anatomopatológicas, bem como sua relação com sobrevida câncer específica e global. **População e Métodos:** Foram avaliados 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis submetidos a tratamento do tumor primário e a linfadenectomia radical ou aqueles pacientes com 5 anos de seguimento sem linfadenectomia. **Resultados:** A imunorreatividade da Involucrina se correlacionou com o Grau de diferenciação tumoral ($p < 0,001$); a presença de infiltração perineural ($p=0,002$) e infiltração de corpos cavernosos ($p=0,021$) e a presença de coilocitose ($p=0,006$) e o tipo Histológico ($p=0,043$). A imunorreatividade da Desmoplakina se correlacionou com Antecedentes Venéreos ($p=0,13$) e o Estadiamento Clínico T ($p=0,002$) e o Tipo Histológico ($p=0,070$). A imunorreatividade da Desmogleína não se correlacionou apenas a infiltração de corpos cavernosos ($p=0,022$) e não houve correlação da imunorreatividade da Plakoglobina com as variáveis clínico-demográficas ou anatomopatológicas. Para o risco de metástase linfonodal, as variáveis significantes na análise univariada foram: a Idade ($p=0,040$); o estadiamento clínico T ($p=0,023$) e o estadiamento clínico N ($p < 0,001$), Grau tumoral ($p < 0,001$), permeação vascular-linfática ($p < 0,001$),

infiltração perineural ($p < 0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p = 0,001$), infiltração da uretra ($p = 0,004$), o tipo de invasão ($p = 0,040$), tipo histológico ($p = 0,003$), imunorreatividade da Involucrina ($p = 0,001$) e a imunorreatividade da Plakoglobina ($p = 0,036$). Permaneceram como variáveis independentes na análise multivariada apenas o Grau histológico (RR = 17,219; IC 95% [3,786 – 78,321]), Infiltração perineural (RR = 7,250; IC 95% [3,577 – 14,693]) e estágio clínico N (RR = 7,429; IC 95% [3,292 – 16,764]). A taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos da população estudada foi de 83,8%, permanecendo como variáveis independentes na análise multivariada a metástase linfonodal (RR = 5,65; IC 95% [3,04 – 10,51]), Grau de diferenciação tumoral (RR = 3,39; IC 95% [1,00 – 11,41]) e espessura tumoral (RR = 2,60; IC 95% [1,10 – 6,16]). A taxa de sobrevida Global em 5 e 10 anos da população estudada foi de 75,3% e 59,2% permanecendo como variáveis independentes na análise multivariada a Idade (RR = 2,68; IC 95% [1,85 – 3,88]), metástase linfonodal (RR = 2,58; IC 95% [1,65 – 4,01]), Grau de diferenciação tumoral (RR = 1,72; IC 95% [1,11 – 2,66]) e embolização perineural (RR = 1,77; IC 95% [1,17 – 2,68]). **Conclusão:** A imunorreatividade da Involucrina se correlacionou com o Grau de diferenciação tumoral; a presença de infiltração perineural; infiltração de corpos cavernoso; a presença de coilocitose e o tipo Histológico. E esteve relacionada com a presença de metástase linfonodal e a sobrevida câncer específica na análise univariada. A imunorreatividade da Desmoplakina se correlacionou com Antecedentes Venéreos e o Estadiamento Clínico T e o Tipo Histológico. Não houve correlação entre a imunorreatividade da Plakoglobina com as variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas. Porém se correlacionou na análise univariada com o risco de desenvolver metástase linfonodal. A imunorreatividade da Desmogleina se correlacionou apenas com infiltração de corpos cavernosos. A análise multivariada para o risco de metástase linfonodal mostrou o Grau histológico, a Infiltração perineural e estágio clínico N como variáveis independentes. A análise multivariada para a Sobrevida câncer específica mostrou a metástase linfonodal, o Grau de diferenciação tumoral e espessura tumoral como fatores independentes de risco para a sobrevida câncer específica. A análise multivariada para a Sobrevida Global mostrou a Idade, a metástase linfonodal, o Grau de diferenciação tumoral e embolização perineural, como fatores independentes para risco de óbito.

SUMMARY

Guimarães GC. [Analysis of prognostic factors and immunohistochemical expression of involucrin and desmosomal proteins: desmoglein, plakoglobin desmoplakin and by "tissue microarray" technique in patients with squamous cell carcinoma of the penis]. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The treatment for invasive penile cancer is based on the treatment of primary tumor, usually with amputation and regional lymphadenectomy, treatments that have a high morbidity rate. The presence of lymph node metastasis is currently the strongest prognostic factor but its evaluation is imperfect using clinical and laboratorial methods. **Objective:** This study aims to identify prognostic factors for primary tumors and the importance of desmosomal Proteins: Desmoglein, Plakoglobina Desmoplakina and Involucrin on the risk of lymph node metastases and the relation of these indices with clinical, demographical and pathological variables and survival (cancer specific and overall survival). **Population and methods:** We studied 288 patients with squamous cell carcinoma of the penis treated with resection of the primary tumor and lymphadenectomy or resection of the primary only and 5 years of follow-up without lymphadenectomy. **Results:** The involucrin immunoreactivity correlated with the grade of tumor differentiation ($p < 0.001$) and the presence of peri-neural infiltration ($p = 0.002$) and infiltration of the cavernous bodies ($p = 0.021$) and koilocytosis ($p = 0.006$) and Histologic type ($p = 0.043$). Desmoplakin immunoreactivity correlated with the Venereal disease ($p = 0.13$) and the clinical stage T ($p = 0.002$) and histological type ($p = 0.070$). Desmoglein immunoreactivity correlate only to the cavernous bodies infiltration ($p = 0.022$) and Plakoglobina immunoreactivity do no correlate with clinical and demographic or pathological variables. Regarding the lymph node metastases risk, the significant variables in univariate analysis were: Age ($p = 0.040$), clinical staging T ($p = 0.023$) and clinical N stage ($p < 0.001$), tumor grade ($p < 0.001$), lymphatic-vascular permeation ($p < 0.001$), perineural infiltration ($p < 0.001$), body cavernoso

infiltration ($p = 0.001$), infiltration of the urethra ($p = 0.004$), type of invasion ($p = 0.040$), histological type ($p = 0.003$), involucrin immunoreactivity ($p = 0.001$) and the immunoreactivity of Plakoglobina ($p = 0.036$). Remained as independent variables in multivariate analysis only histological grade (RR = 17.219, 95% CI [3.786 to 78.321]), perineural infiltration (RR = 7.250, 95% CI [3.577 to 14.693]) and clinical N stage (RR = 7.429 95% CI [3.292 to 16.764]). The rate of disease-free survival at 5 years for the study population was 83.8%, remaining as independent variables in the multivariate analysis, lymph node metastasis (RR = 5.65, 95% CI [3.04 to 10.51]) Grade of tumor differentiation (RR = 3.39, 95% CI [1.00 to 11.41]) and tumor thickness (RR = 2.60, 95% CI [1.10 to 6.16]). The overall survival rate at 5 and 10 years for the study population was 75.3% and 59.2% remaining as independent variables in the multivariate analysis, age (RR = 2.68, 95% CI [1.85 to 3, 88]), lymph node metastasis (RR = 2.58, 95% CI [1.65 to 4.01]), grade of tumor differentiation (RR = 1.72, 95% CI [1.11 to 2.66]) and perineural embolization (RR = 1.77, 95% CI [1.17 to 2.68]). **Conclusion:** The involucrin immunoreactivity correlated with grade of tumor differentiation and the presence of peri-neural infiltration, infiltration of cavernous bodies and the presence of koilocytosis and histological type. And was associated with lymph node metastasis and cancer specific survival in univariate analysis. Desmoplakina Immunoreactivity correlated with Venereal history and the clinical stage T and Histologic Type. There was no correlation between the immunoreactivity of Plakoglobina with clinical and demographic variables and pathological data. But correlated in univariate analysis with the risk of developing lymph node metastasis. Desmoglein immunoreactivity correlated only with infiltration of the cavernosum corpora. Multivariate analysis for risk of lymph node metastasis showed the histological grade, perineural infiltration and clinical stage N as independent variables. Multivariate analysis for cancer specific survival showed lymph node metastasis, the degree of tumor differentiation and tumor thickness as independent risk factors for cancer specific survival. Multivariate analysis for overall survival showed age, lymph node metastasis, the degree of tumor differentiation and perineural embolization as independent factors for risk of death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do gene da involucrina e seqüência das regiões regulatórias.....	23
Figura 2	Esquema da cooperação da região regulatória distal e da região regulatória proximal para a expressão gênica apropriada.....	31
Figura 3	Modelo ultra-estrutural e molecular dos Desmossomos.....	35
Figura 4	Representação esquemática da interação da Plakoglobina e Desmoplakina pela fosforilação protéica.....	38
Figura 5	Padrões de diferenciação-dependente das proteínas desmossômicas na epiderme.....	43
Figura 6	Estadiamento TNM.....	65
Figura 7	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<25%) para a Involucrina. (aumento 100x).....	75
Figura 8	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>25%) para a Involucrina. (aumento 200x).....	75
Figura 9	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<10%) para a Desmoplakina. (aumento 200x)...	76
Figura 10	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>10%) para a Desmoplakina. (aumento 200x)....	76
Figura 11	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<50%) para a Plakoglobina. (aumento 200x).....	77

Figura 12	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>50%) para a Plakoglobina. (aumento 200x).....	77
Figura 13	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<50%) para a Desmogleina. (aumento 200x).....	78
Figura 14	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>50%) para a Desmogleina. (aumento 200x).....	78
Figura 15	Caracterização do estadiamento clínico T dos 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.....	81
Figura 16	Caracterização do estadiamento clínico N dos 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.....	82
Figura 17	Curva de sobrevida câncer específica para os 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.....	106
Figura 18	Curva de sobrevida Global para os 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do anticorpo primário utilizado, clones, título de diluição e fabricantes.....	73
Tabela 2	Freqüência das variáveis clínicas e demográficas dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	80
Tabela 3	Número e porcentagem de pacientes segundo estadiamento clínico T e N dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	81
Tabela 4	Freqüência de variáveis anatomopatológicas do tumor primário dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	83
Tabela 5	Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 125 pacientes portadores de câncer de pênis.....	84
Tabela 6	Número e porcentagem de linfonodos, segundo tipo de esvaziamento linfonodal.....	85
Tabela 7	Número e porcentagem de pacientes segundo a topografia dos linfonodos metastáticos.....	86
Tabela 8	Situação clínica dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.....	87
Tabela 9	Imunorreatividade da Involucrina segundo as variáveis clínico - demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano....	94
Tabela 10	Imunorreatividade da involucrina segundo variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	95
Tabela 11	Imunorreatividade da Desmoplakina segundo as variáveis clínico - demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano....	96
Tabela 12	Imunorreatividade da Desmoplakina segundo as variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	97
Tabela 13	Imunorreatividade da Plakoglobina segundo as variáveis clínico - demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano....	98

Tabela 14	Imunorreatividade da Plakoglobina segundo as variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	99
Tabela 15	Imunorreatividade da Desmogleina segundo as variáveis clínico - demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	100
Tabela 16	Imunorreatividade da Desmogleina segundo as variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	101
Tabela 17	Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	102
Tabela 18	Status linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímica dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	103
Tabela 19	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.....	104
Tabela 20	Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal em 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	105
Tabela 21	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	106
Tabela 22	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	108
Tabela 23	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com a gradação imunoistoquímica de Involucrina, Desmogleina, Plakoglobina e Desmoplakina em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	109
Tabela 24	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20...	109
Tabela 25	Modelo multivariado para a sobrevida câncer específica em pacientes portadores de carcinoma peniano em 288 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	110

Tabela 26	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	112
Tabela 27	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	113
Tabela 28	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com a gradação imunoistoquímica de Involucrina, Desmogleina, Plakoglobina e Desmoplakina em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	114
Tabela 29	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20...	115
Tabela 30	Risco de óbito em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

- DNA** Acido desoxiribonucleico.
- DP** Desmoplakina
- DRR** (DISTAL REGULARORY REGION) Região Regulatória distal
- Dsgs** Desmogleínas
- HE** Hematoxilina-eosina
- hINV** Gene da Involucrina
- HPV** Papilomavirus Humano
- PG** Plakoglobina
- PKP** Plakofilina
- PRR** (PROXIMAL REGULATION REGION) Região Regulatória Proximal
- URR** (ULTRA-REGULATION REGION) Região de Ultra-Regulação

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1	Aspectos Morfológicos do Carcinoma Epidermoide do Pênis	12
2.2	Fatores Prognósticos	14
2.3	Involucrina	20
2.3.1	Região promotora da involucrina – a região regulatória distal (DRR).....	23
2.3.2	A Região DRR é necessário e suficiente para expressão normal de hINV “In Vivo”	27
2.3.3	Caracterização da PRR.....	29
2.3.4	Modelo de Regulação do Gene da Involucrina.....	31
2.4	Desmosomos	32
2.4.1	Regulação da estrutura desmossômica e adesão	33
2.4.2	Composição desmossômica, estrutura e função.....	34
2.4.3	Estrutura e Composição Molecular.....	34
2.4.4	A placa desmossômica.....	36
2.4.5	O Núcleo Adesivo.....	39
2.4.6	Função Desmossômica.....	40
2.4.7	Regulação desmossômica e remodelamento durante desenvolvimento e diferenciação	42
2.4.8	Regulagem pós-transducional dos componentes desmossômicos	46
2.4.9	Dependência nas junções aderentes	49
2.4.10	Processamento Proteolítico	50
2.4.11	Outras modificações pos-transducionais que regulam a organização e destino de moléculas desmossômicas.....	51
2.4.12	Proteínas Desmossômicas na Sinalização.....	54
2.4.13	Considerações Finais	58
3	OBJETIVOS.....	60

4	POPULAÇÃO E MÉTODOS	62
4.1	Critérios de Inclusão	63
4.2	Critérios de Exclusão	64
4.3	Diagnóstico	64
4.4	Estadiamento	65
4.5	Procedimento Cirúrgico	66
4.6	Seguimento dos pacientes	66
4.7	Exame Anatomopatológicos do Tumor primário.....	67
4.8	Técnica de TMA	69
4.9	Protocolo de Reações – TMA	71
4.9.1	Imunoistoquímica.....	71
4.10	Interpretação das reações imunoistoquímicas.....	73
4.11	Caracterização da população de estudo	79
4.11.1	Aspectos demográficos e clínicos.....	79
4.11.2	Aspectos cirúrgicos.....	84
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	88
6	ANÁLISE DE RISCO E ASPECTOS ÉTICOS.....	91
7	RESULTADOS	93
7.1	Reações imunoistoquímicas.....	94
7.1.1	Imunoistoquímica da Involucrina	94
7.1.2	Imunoistoquímica da Desmoplakina.....	96
7.1.3	Imunoistoquímica da Plakoglobina.....	98
7.1.4	Imunoistoquímica da Desmogleina.....	99
7.2	Avaliação do risco de metástases linfonodais.....	101
7.2.1	Análise univariada.....	101
7.2.2	Análise multivariada	104
7.3	Análise de sobrevida	105
7.3.1	Sobrevida câncer específica.....	105
7.3.2	Sobrevida Global.....	110

8	DISCUSSÃO.....	117
8.1	Aspectos Gerais.....	118
8.2	Imunoistoquímica da Involucrina	122
8.3	Imunoistoquímica da Desmoplakina.....	125
8.4	Imunoistoquímica da Plakoglobina.....	127
8.5	Imunoistoquímica da Desmogleina.....	130
8.6	Avaliação do risco de metástase Linfonodal.....	132
8.7	Análise da sobrevida	134
8.7.1	Sobrevida câncer específica	134
8.7.2	Análise multivariada	135
8.8	Sobrevida Global.....	135
8.8.1	Análise univariada.....	135
8.8.2	Análise multivariada	136
9	CONCLUSÕES.....	137
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de levantamento de dados

Anexo 2 Construção do TMA

Anexo 3 Acis III: Especificações do Produto

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular do pênis corresponde por aproximadamente 95% das neoplasias malignas deste órgão (SCHELLHAMMER et al. 1992). Correspondendo entre 0.4 a 0.6% das neoplasias malignas em países desenvolvidos (GLOECKLER-RIES et al. 1990) e podendo chegar a mais de 10% em alguns países da África e da América do Sul.

Os linfonodos regionais são o sítio preferencial de disseminação metastática, sendo as metástases por via hematogênica raras, ocorrendo entre 1 a 10% (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978). As metástases linfonodais quando não tratadas tendem a ulcerar e se fixar ao feixe vaso-nervoso e a morte destes pacientes ocorrem em torno de dois anos quando estas não são tratadas (BEGGS e SPRATT 1964; DERRICK et al. 1973) devido a sepsis, hemorragias por ruptura dos grandes vasos e caquexia.

A presença de linfonodos palpáveis ao diagnóstico pode variar de 20 a 96%, sendo a linfadenectomia o único tratamento eficaz para as metástases linfonodais, porem esta apresenta alto índice de morbidade (30 a 86%), criando muitas objeções, principalmente porque até 50% dos linfonodos clinicamente tumorais não apresentam comprometimento ao estudo anatomopatológico (falso positivo). Da mesma forma 20% dos linfonodos clinicamente não suspeitos apresentam comprometimento microscópico (falso negativo) (CATALONA 1980; SUFRIN e HUBEN 1987; LOPES et al. 1996a).

Para se evitar ou diminuir a extensão das linfadenectomias e suas conseqüências, vários procedimentos foram propostos, como a biópsia do linfonodo sentinela descrita por CABANAS (1977), porém a reprodutibilidade por outros autores não foi comprovada (LOPES et al. 1996a).

Posteriormente um método de pesquisa do linfonodo sentinela utilizando-se linfocintilografia pré-operatória e o auxílio de um “gama-probe” intra-operatório foi proposto como um método promissor para diminuir o número de linfadenectomia desnecessárias (HORENBLAS et al. 2000). Entretanto, TANIS et al. (2002), avaliando 90 pacientes, relataram um índice de falso negativo de 22%, e sensibilidade para o método de 80%, índices semelhantes a avaliação clínica, levantando dúvidas sobre a eficiência do mesmo.

Por ser o fator prognóstico mais importante e a sua avaliação não poder ser feita de forma confiável por exames de imagem ou clínico o desenvolvimento de outros meios para se avaliar o risco do comprometimento linfonodal e diminuir o número de linfadenectomias, se faz necessário (LOPES 1995; LOPES et al. 1996b).

Com este intuito, vários estudos utilizando fatores clínicos e anatomopatológicos do tumor primário e suas possíveis implicações no risco de metástases linfonodais foram desenvolvidos, entretanto sem trazer grandes contribuições aos dados já disponíveis.

Recentemente muitos estudos têm tentado empregar biomarcadores como potenciais fatores prognósticos em diferentes tipos de neoplasias. Entre os biomarcadores encontram-se os componentes da placa desmossômica (Desmogleina, Plakoglobina e Desmoplakina) e a Involucrina, dentre outros. É crescente o número de publicações utilizando estes marcadores, com enfoque na pesquisa de fatores

prognósticos adicionais em múltiplos sítios de neoplasias, como por exemplo: câncer de próstata (SHIINA et al. 2005); câncer de ovário e mama (ABERLE et al. 1995); carcinomas de pulmão não-pequenas células (WINN et al. 2002); câncer de bexiga (CANES et al. 2005); Câncer de Cabeça e Pescoço e boca (WANG et al. 2007); neoplasias de colo uterino, e lesões pré-malignas da cérvix (ALAZAWI et al. 2003); e muitos outros.

Desta forma, o estudo de fatores de componentes da placa desmossômica (Desmogleina, Plakoglobina e Desmoplakina) e a Involucrina, associados a parâmetros clínicos e patológicos do tumor primário na determinação do risco de metástase linfonodal em pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis, poderá ser importante na seleção dos reais candidatos a linfadenectomia e com isto evitar morbidades desnecessárias associada ao procedimento

Apesar de extensamente estudados estes biomarcadores não foram utilizados na avaliação prognóstica do carcinoma espinocelular do pênis podendo desempenhar um papel importante neste tipo de neoplasia.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Apesar de raro em países desenvolvidos o carcinoma peniano permanece um problema sério nos países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos e na Europa, corresponde a menos de 0,4% de todas as doenças malignas nos homens (MOSCONI et al. 2005; GOODMAN et al. 2007; BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007) e, nos Estados Unidos, a incidência tem diminuído nos últimos 30 anos (BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007). As incidências de carcinoma de pênis também são modestas na China (DAI et al. 2006), bem como no Reino Unido, onde é de 0,6 por 100.000 homens (RITCHIE et al. 2004).

Em contraste, o carcinoma de pênis é relativamente comum na Índia (KAMAT et al. 1993), África (PERSKY 1997), e América do Sul. A incidência ajustadas por idade nestas regiões variam entre 2,3-8,3 por 100.000 homens (BRUMINI 1982; VELAZQUEZ E CUBILLA 2007). O câncer de pênis corresponde a aproximadamente a 2,1% dentre as neoplasias malignas no Brasil. A incidência é aumentada nas regiões norte-nordeste, aonde são piores as condições sócio-econômicas (BRUMINI 1982). Dados mais recentes sugerem que em algumas áreas no Brasil, é a doença maligna mais comum em homens, sendo responsável por 17% de todas as doenças malignas. A maior incidência desta neoplasia é nas regiões de Barshi, Paranda e Bhum, na Índia (3,32 casos / 100000 habitantes) e os menores índices entre os judeus nascidos em Israel e EUA (0/100000 e 0,07/100000 respectivamente), o que levanta a possibilidade de que a circuncisão seja uma estratégia eficaz de prevenção deste tumor.

O câncer de pênis tem incidência aumentada a partir da sexta década de vida (GURSEL et al. 1973; DERRICK et al. 1973). Este tumor é infrequente em adultos abaixo de 30 anos, sendo raramente descrito em crianças (DEAN 1935; NARASIMHARAO et al. 1985). No Brasil a maior incidência esta entre a 4ª e 7ª décadas de vida.

Dentre os principais fatores de risco para o câncer de pênis estão: a presença de fimose, más condições de higiene e baixo padrão sócio-econômico (PAYMASTER e GANGDHARAN 1967; BRINTON et al. 1991). Já a circuncisão apresenta fator protetor para o desenvolvimento desta neoplasia. Aspectos religiosos e culturais bem como a idade de realização da postectomia têm papel fundamental na incidência desta neoplasia (FREW et al. 1967; JOHNSON et al. 1973). Nos judeus postectomizados logo após o nascimento a incidência parece ser nula. Na Índia, entre os mulçumanos que são operados entre os 3 e 12 anos de idade a incidência é em torno de 0,15%, enquanto, nos hindus não operados a incidência chega a 3,1% (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; LOPES et al. 1993).

Apesar de a circuncisão ser importante na prevenção, populações com melhores níveis socioeconômicos e culturais onde higiene adequada é realizada, apresentam baixos índices desta neoplasia. Na Dinamarca com taxa de postectomia de apenas 1,6%, a incidência do carcinoma de pênis caiu de 1,15/100.000 homens para 0,82/100.000 homens. Sendo este fato atribuído à melhora da higiene, já que neste país houve aumento de 35% em 1940 para 90% em 1990 de habitações com acesso a água encanada (FRISCH et al. 1995).

Recentemente tem-se relacionado à infecção pelo HPV, o número de parceiros sexuais e a exposição ao tabaco com maior risco de desenvolvimento do

carcinoma de pênis (HELLBERG et al. 1987; BRINTON et al. 1991; ROSEMBERG et al. 1991). A relação causal entre o cigarro e câncer de pênis não está bem estabelecida, apesar de alguns trabalhos evidenciarem risco aumentado entre os fumantes (HELLBERG et al. 1987; HARISH e RAVI 1995).

O HPV afeta o epitélio escamoso da genitália masculina da mesma forma que a feminina, incluindo a formação de condilomas e a transformação neoplásica (SARKAR et al. 1992). O HPV 6 e 11 está mais comumente associado a verrugas genitais, podendo ser encontrado no carcinoma verrucoso. Enquanto que os tipos 16, 18, 31 e 33 são associados com carcinoma "in situ" e invasivo (WIENER e WALTHER 1995). O HPV 16 é o mais frequentemente detectado na lesão primária e já foi descrito nas lesões metastáticas (VARMA et al. 1991; IWASAWA et al. 1993).

O número de parceiros sexuais foi descrito como fator de risco para o câncer de pênis, devido a maior incidência de infecção pelo HPV nestes homens (MADEN et al. 1993). Apesar da alta taxa de infecção pelo HPV no câncer peniano a sua presença varia de 31 a 63% dos casos (WIENER et al. 1992), indicando que fatores adicionais devem estar envolvidos.

A prevalência de HPV-DNA em parceiros sexuais de mulheres infectadas pelo HPV gira em torno de 70% dos casos (NICOLAU et al. 2005). A associação entre câncer de pênis e HPV é bastante variável na literatura variando de 10 a 80% (SCHEINER et al. 2008) Tal disparidade pode ser explicada pelos diferentes métodos utilizados para pesquisa do HPV (PCR, hibridação *in situ*, Southern blotting).

Um estudo recente, revisando dados de mais de 1.200 casos de câncer de pênis e HPV-DNA, com distribuição similar dos casos na Europa, América do Norte,

Ásia e América do Sul, observou uma prevalência do HPV de 47,9%, variando de 22,4% nos carcinomas verrucosos até 66,3% nos subtipos basalóides e Warty. O HPV 16 foi o mais prevalente (30,8%) seguido pelo HPV 6 (6,7%) e HPV 18 (6,6%) (BACKES et al. 2009). A presença do HPV, no entanto, parece não influenciar o prognóstico do carcinoma de pênis, embora esse achado ainda seja controverso (LONT et al. 2006; SCHEINER et al. 2008).

Não parece haver distinção entre a raça negra e branca, quando se compara nível social semelhante (VATANASAPT et al. 1995).

O câncer de pênis geralmente inicia-se como uma lesão em glândula, que quando não tratada estende-se para o prepúcio e o corpo, invadindo corpos cavernosos, esponjosos e uretra chegando à auto-amputação. As metástases linfonodais para região inguinal e ilíaca são via de disseminação precoce no carcinoma peniano (NARAYAMA et al. 1982; PERSKY e DIKERNION 1986; LOPES et al. 1994). As metástases por via hematogênica são infrequentes ocorrendo entre 1 a 10% (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978). Nos casos avançados, as complicações locais-regionais com tumor infiltrando feixe vasculo-nervoso, levando a hemorragia e sepse são as principais causas de morte (PURAS et al. 1978; POMPEU 1993).

As lesões pequenas em estágio inicial podem ser tratadas com ressecção cirúrgica ou radioterapia. Podem ser realizada a técnica micrográfica de Mohs (MOHS et al. 1992) ou laser em casos excepcionais. Nos casos avançados a amputação parcial ou total ainda se faz necessária.

A presença de linfonodos palpáveis varia de 20 a 96% dos casos (SUFRIN e HUBEN 1987; HEGARTY et al. 2006). Cerca de 50% dos linfonodos inguinais

cl clinicamente tumorais não apresentam comprometimento anatomopatológico pelo tumor. A linfonodomegalia, nestes casos, ocorre como consequência de infecção associada ao tumor primário (BEGGS e SPRATT 1964; CATALONA 1980; LOPES et al. 1996a). Por outro lado, 20% dos pacientes com linfonodos clinicamente negativos, apresentam metástases microscópicas (BEGGS e SPRATT 1964; DEKERNION et al. 1973).

A dissecação linfonodal inguino-iliaca é parte importante da terapêutica, porém, apresenta índices elevados de morbidade e a seleção dos pacientes deve ser criteriosa (BEGGS e SPRATT 1964; KAMAT et al. 1993; COBLENTZ e THEODORESCU 2002). Dentre as principais complicações se encontram: necrose dos retalhos (14 a 16%); infecção de ferida operatória em 10%; seroma e linfedema de 19% a 50% (HERR 1992).

Diversos métodos foram tentados para melhorar a acurácia da avaliação linfonodal. A avaliação dos linfonodos por exame clínico ou exames de imagem não é confiável (CATALONA 1980; SRINIVAS et al. 1987). A punção por agulha fina dos linfonodos suspeitos pode ser realizada para avaliação loco-regional, entretanto apenas resultados positivos devem ser valorizados pela baixa sensibilidade do método (HORENBLAS et al. 1991; BURGESS et al. 1992; KROON et al. 2005a). SAISORN et al. (2006) mostrou sensibilidade de 93% e sensibilidade de 91% em pacientes com linfonodomegalia suspeita, porém apenas 25 pacientes foram avaliados.

A biópsia do linfonodo sentinela descrita por CABANAS (1977), apresentou alto índice de falso-negativo (PERINETTI et al. 1980; WESPER et al. 1986) e a linfocintilografia descrita por HORENBLAS et al. (2000) com a utilização de gama-

probe no intra-operatório, mostrou índices de falso-negativos em torno de 16 a 20% (TANIS et al. 2002; KROON et al. 2004).

Dados anatomopatológico do tumor como o grau de diferenciação, apresenta correlação com a probabilidade de envolvimento linfonodal (FRALEY et al. 1989; HORENBLAS et al. 1993). LOPES et al (1996b) comprovou a presença de êmbolo tumoral linfático e vascular e a espessura tumoral como fatores histológicos associados com o risco de metástase linfonodal, da mesma forma que a invasão de corpos cavernosos, uretra ou outros órgãos aumentam significativamente o risco de metástases inguinal (FRALEY et al. 1989; HEYNS et al. 1997).

A partir destes dados, as indicações atuais para linfadenectomia, mesmo com gânglios negativos são: tumores em estágio pT2, grau 3 anatomopatológico e invasão linfo-vascular. Nestes casos a incidência de linfonodos positivos é maior do que 50% (KROON et al. 2005b).

Fatores clínicos ou anatomopatológicos isoladamente ou em conjunto são insuficientes para o estadiamento preciso, desta forma fatores biomoleculares devem ampliar as ferramentas disponíveis para uma melhor avaliação dos pacientes (LOPES et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2006; CAMPOS et al. 2006; SOARES et al. 2006). Um melhor estadiamento pré-operatório permitirá um planejamento terapêutico mais adequado evitando morbidade de cirurgias desnecessárias.

A utilização do método imunoistoquímico baseia-se na detecção de antígenos cuja expressão tenha relação qualitativa ou quantitativa, que possam estar correlacionados com fatores prognósticos em diferentes tipos de neoplasia.

2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CARCINOMA DE PÊNIS

Os carcinomas penianos correspondem a mais que 95% dos casos, sendo que os carcinomas epidermóides usuais constituem o grupo mais comum (BRODERS 1922; GENTIL et al. 1965), sendo outras histologias raras (LOWE e MCKEE 1983; SROUGI e SIMON 1990, GUIMARÃES et al. 2003; KATONA et al. 2006; HANKINS et al. 2006). Fatores anatomopatológicos do tumor, como o grau de diferenciação (FRALEY et al. 1989; HORENBLAS et al. 1993), e o padrão de invasão tumoral (GUIMARÃES et al. 2006) se correlacionam com a incidência de metástases linfonodais.

A recente classificação histopatológica dos carcinomas penianos divulgada pela OMS destaca uma variedade de subtipos histológicos tais como os carcinomas basalóides, as variantes verrucosas (*Warty*, papilífero, *cuniculatum*), os carcinomas sarcomatóides e outras variantes raras (CUBILLA et al. 2001). Recentemente alguns trabalhos tem validado esta classificação (GUIMARÃES et al. 2009).

Os carcinomas condilomatosos, também chamados de tumores do tipo *Warty*, correspondem a 20% das neoplasias de aspecto verruciforme. Acometem geralmente homens na quinta década de vida. Acometem tanto a glânde como o sulco coronal e o prepúcio. As células tumorais tendem a se agrupar em arranjos papilomatosos sendo a coilocitose um achado comum com núcleos geralmente grandes, hipercromáticos e achatados e apresentam associação com HPV-16 e HPV-6. O prognóstico é bom e metástases quando ocorrem, estão associadas a tumores com invasão profunda (VELAZQUEZ e CUBILLA 2007).

Os carcinomas epidermóides papilares, são tumores bem diferenciados,

hiperkeratóticos que crescem em arranjos papilares. Não são associados ao HPV e raramente metastatizam para linfonodos e acometem homens na quinta e sexta décadas (VELAZQUEZ e CUBILLA 2007; CHAUX et al. 2010a).

O carcinoma basalóide é um subtipo agressivo associado ao HPV e representa de cinco a dez por cento dos tumores penianos. Geralmente acomete a glândula de indivíduos na sexta década de vida e tem um caráter mais infiltrativo. As células são pequenas, com pouco citoplasma e baixa atividade mitótica. Tendem a dar metástases precoce para linfonodos e a taxa de mortalidade é alta (CUBILLA et al. 1998; CHAUX et al. 2010b).

Os carcinomas sarcomatóides podem surgir nas recidivas de CEC convencionais ou após radioterapia. São tumores agressivos, formados por células fusocelulares com aspectos semelhantes aos de um sarcoma. A taxa de metástase para linfonodos é alta e o prognóstico reservado (VELAZQUEZ et al. 2005; VELAZQUEZ e CUBILLA 2007; AXCRONA et al. 2010).

Outras variantes de apresentação mais raras, mas com aparente importância clínica, incluem os carcinomas acantolíticos (CUNHA et al. 2009). Até ¼ dos carcinomas penianos apresenta mais de um padrão sendo considerados carcinomas mistos. Fato relevante, uma vez que, apresentam comportamentos distintos (CHAUX et al. 2010b).

Basicamente encontramos três padrões de crescimento dos tumores penianos: superficial (crescimento horizontal), invasivo (crescimento vertical) e multicêntrico e podem se espalhar de um compartimento mucoso ao outro. Tipicamente os carcinomas do prepúcio se estendem ao sulco coronal ou à glândula e vice versa. Verticalmente, podem infiltrar a fáscia peniana e atingir corpo esponjoso e corpos

cavernosos. Este padrão de crescimento é um fator importante na determinação do comportamento biológico do tumor. LOPES et al. (1996b) observou a presença de êmbolos tumorais em vasos linfáticos e venosos e a espessura do tumor como fatores histológicos que aumentam o risco de metástase para os linfonodos da mesma forma que a invasão de corpos cavernosos, uretra ou outros órgãos aumenta significativamente o risco de metástases inguinais (FRALEY et al. 1989; HEYNS et al. 1997).

Outros três fatores morfológicos recentemente descritos são extremamente importantes na avaliação dos espécimes cirúrgicos. O primeiro deles é o tipo de frente de invasão observado. Tumores com frente de invasão caracterizados por pequenos blocos infiltrativos têm pior prognóstico comparado com aqueles que apresentam padrão “pushing” (GUIMARÃES et al. 2006). O segundo fator é a observação de focos de tumor pouco diferenciados. A indiferenciação focal do tumor, mesmo quando menor do que 5% da massa tumoral, é um fator de pior prognóstico e sua importância supera a espessura do tumor (VELAZQUEZ et al. 2008). Finalmente, a invasão perineural é um fator recentemente destacado e aparentemente de grande importância prognóstica ainda aguardando validação em outras séries (VELAZQUEZ et al. 2008).

2.2 FATORES PROGNÓSTICOS

É consenso que a presença de metástases para linfonodos constitui o principal fator prognóstico no carcinoma de pênis (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977; NARAYAMA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; KAMAT et al. 1993;

POMPEU 1993; HORENBLAS et al. 1993; HORENBLAS e VAN TITEREN 1994; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996b). SUFRIN e HUBEN (1987) estudaram a sobrevida cumulativa de várias séries e encontraram sobrevida global de 51,6%. Considerando-se pacientes com linfonodos metastáticos e não metastáticos, a sobrevida em 5 anos foi de 27,5 e 66,2% respectivamente.

Da mesma forma HORENBLAS e VAN TITEREN (1994), mostraram índices de sobrevida de 50 e 93% em cinco anos para pacientes com e sem metástases em linfonodos, enquanto SRINIVAS et al. (1987) apresentaram índices de 28 e 74% respectivamente.

A extensão do comprometimento dos linfonodos foi avaliada por SRINIVAS et al. (1987) que classificaram os pacientes com metástases em um linfonodo de N1, de 2 a 6 linfonodos de N2 e mais de 6 linfonodos de N3a. Aqueles que tinham linfonodos comprometidos bilaterais foram classificados de N3b e os pacientes com doença extranodal de N4. Estes autores demonstraram que pacientes com envolvimento mínimo (N1 e N2) tiveram sobrevida em cinco anos de 50 a 80%, enquanto aqueles com comprometimentos mais extensos (N3b e N4) a sobrevida foi de 4 a 12%. BAKER et al. (1976), JOHNSON e LO (1984) e FRALEY et al. (1989) acreditam que pacientes com até dois linfonodos comprometidos ainda podem ter um bom prognóstico. HORENBLAS et al. (1993) relataram que pacientes com mais de dois linfonodos inguinais comprometidos apresentam maior incidência de metástases contralaterais e pélvicas e maior probabilidade de óbito pela doença.

LOPES et al. (1996b), analisaram 13 pacientes com linfonodos ilíacos positivos e observaram que quatro dos cinco pacientes (80%) que sobreviveram tinham apenas um linfonodo ilíaco positivo, já no grupo de sete pacientes com mais

de um linfonodo ilíaco comprometido apenas um (14%) estava livre de doença no longo prazo.

Com exceção das lesões localizadas no prepúcio, que apresentam metástases em menos de dez por cento dos casos e permitem cirurgias conservadoras, o sítio do tumor primário não parece influenciar no prognóstico (DEKERNION et al. 1973; WAJSMAN et al. 1977). DEKERNION et al. (1973) relataram que 17 de 25 (68%) pacientes com tumores comprometendo o corpo cavernoso apresentavam metástases para linfonodos, enquanto os seis casos com comprometimento de prepúcio e glândula evoluíram sem metástases ou recidivas. SOLSONA et al. (1992) relataram que 64,3% dos pacientes com invasão do corpo cavernoso apresentavam metástases linfonodais contra 4,2% daqueles sem invasão e posteriormente confirmou este achado em uma análise prospectiva, mostrando 11% de metástase para linfonodos nos pacientes com estágio T1, contra 63% nos estágios T2 e T3 (SOLSONA et al. 2001).

A maioria dos autores concorda que tumores maiores com crescimento vertical apresentam maior incidência de metástases para linfonodos, que aqueles menores com crescimento mais superficial (DEKERNION et al. 1973, WAJSMAN et al. 1977, FRALEY et al. 1985, 1989; CUBILLA et al. 1993; KAMAT et al. 1993; HORENBLAS et al. 1993; ADEYOUJU et al. 1997; HALL et al. 1998). Na série de HORENBLAS et al. (1993), tumores entre dois e cinco centímetros apresentaram incidência de metástases em linfonodos de 79% contra 47% dos tumores com até dois centímetros, enquanto FRALEY et al. (1985) refere sobrevida de 82 versus 74% para pacientes com ponto de corte de três centímetros. HALL et al. (1998) relataram que tumores com profundidade maior que cinco milímetros apresentavam maior

incidência de metástases em linfonodos. LOPES et al. (1996b) mostraram que tumores com espessura de cinco milímetros apresentavam maior risco de metástase em linfonodos apenas na análise univariada ($p=0,02$). A presença de invasão vascular e linfática por células neoplásicas foi fator prognóstico significativo nos estudos de FRALEY et al. (1989), LOPES et al. (1996b) e de SLATON et al. (2001).

A maioria dos autores relata que o grau de diferenciação celular é outro fator importante no câncer do pênis, tanto em relação à incidência de metástases em linfonodos, quanto em relação à sobrevida global (SRINIVAS et al. 1987; POMPEU 1993; SLATON et al. 2001). Pacientes com tumores pouco diferenciados têm mais metástases e pior sobrevida que aqueles com lesões bem diferenciadas (FRALEY et al. 1985; SOLSONA et al. 1992; HORENBLAS et al. 1993; HORENBLAS e VAN TITEREN 1994; ORNELLAS et al. 1994; SLATON et al. 2001). SOLSONA et al. (2001) mostrou risco de metástase linfonodal para pacientes com tumores grau 1 de diferenciação de 15%, contra 67% para grau 2 e 75% para o grau 3. Recentemente, VELAZQUEZ et al. (2008) demonstraram que tumores indiferenciados superficiais comportam-se pior do que aqueles bem diferenciados profundamente invasores.

Nos últimos anos o interesse para a avaliação de marcadores moleculares em pacientes com tumores penianos tem aumentado, devido a uma possível associação desses marcadores com o prognóstico podendo selecionar os pacientes que se beneficiariam ou não da linfadenectomia.

A presença do DNA do HPV no tumor primário, não parece influenciar a incidência de metástases linfonodais nem a sobrevida (MCCANCE et al. 1986; VILLA e LOPES 1986; BEZERRA et al. 2001a e b). Entretanto, quando a presença do DNA do HPV encontra-se associado à imunorreatividade para o p53, relaciona-se

a um prognóstico ruim (LOPES et al. 2002).

A imunexpressão da proteína p53 foi relacionada como fator independente para o risco de metástase para linfonodos (LOPES et al. 2002; MARTINS et al. 2002). LOPES et al. (2002), estudando a expressão de p53 e HPV-DNA em 83 casos de carcinoma epidermóide de pênis, encontraram associação entre a imunexpressão do p53 com estágio N, comprometimento linfonodal, embolização venosa e linfática. Pacientes negativos para p53 tiveram sobrevida global significativamente melhor que aqueles com tumores que marcaram para p53 e quando os tumores foram positivos ao mesmo tempo para p53 e HPV-DNA a sobrevida global foi pior (LOPES et al. 2002). Ainda em seu trabalho, LOPES et al. (2002), encontraram que quanto maior a positividade para p53, maior o risco de comprometimento linfonodal e pior sobrevida.

Moléculas de adesão e invasão foram avaliadas por CAMPOS et al. (2006) que estudaram 125 casos de câncer de pênis e encontraram que a alta expressão de matriz de metaloproteinase 9 (MMP-9) foi fator independente para recorrência da doença, enquanto que a baixa expressão da E-Caderina esteve associada a maior risco de comprometimento linfonodal, na análise univariada. Ainda com referência às moléculas de adesão, PROTZEL et al. (2008) avaliaram a imunorreatividade de KAI1/CD82 em 30 casos de câncer peniano e encontraram que os pacientes com expressão baixa ou ausente de KAI1/CD82 tinham comprometimento linfonodal e que os pacientes com alta expressão mostraram uma sobrevida significativamente melhor quando comparados com os outros grupos.

Os marcadores de proliferação celular PCNA, MIB-1/Ki67 foram avaliados em 125 casos de câncer de pênis por GUIMARÃES et al. (2007), que não

encontraram associação com variáveis clínicas e demográficas ou anatomopatológicas, no entanto o MIB-1/Ki67 apresentou-se como fator de risco independente para metástase linfonodal (GUIMARÃES et al. 2007). PROTZEL et al. (2007) avaliando em 28 casos a expressão de Ki67 e HPV-DNA dividiu a expressão de Ki67 em fraca (<15% das células), intermediária (15-60%) e forte (>60%). Eles observaram uma associação entre maior expressão de Ki67 e comprometimento de linfonodos e também, quando estratificados em maior e menor que 50%, observou-se uma diferença significativa com relação a sobrevida global.

Outros marcadores moleculares têm sido investigados, porém com conclusões limitadas pelo pequeno número de casos estudados. Ainda podemos citar artigos com casos isolados ou poucos casos avaliando anormalidades cromossômicas no carcinoma de pênis. ALVES et al. (2001) avaliando 26 pacientes através de hibridação genômica comparativa, mostraram alterações de números de cópias da seqüência do DNA semelhantes à observadas em outras neoplasias escamosas, sendo que os ganhos mais comuns ocorreram nas regiões 8q24, 16p11-12, 20q11-13, 22q, 19q13 e 5p15 e as deleções mais comuns nas regiões 13q21-22, 4q21-32 e no cromossomo X. A classificação desses pacientes com relação ao número de alterações de cópias do DNA mostrou uma possível correlação com o prognóstico.

KROON et al. (2008) estudou o perfil de expressão gênica em 56 casos de carcinoma de pênis, dos quais 32 tinham comprometimento de linfonodos e não encontrou um grupo de genes capaz de identificar pacientes com linfonodos positivos. Dos 44 genes diferentemente expressos, 20 estavam relacionados à indução de resposta inflamatória, o que pode ter gerado viés em estudo de expressão gênica (KROON et al. 2008). Alterações epigenéticas também têm sido estudadas.

GUERRERO et al. (2008) estudaram a hipermetilação do gene da trombospondina 1, RASSF1-A e p16, em 24 casos de carcinoma de pênis, observando hipermetilação em 46%, 42% e 38% dos tumores, sendo que a hipermetilação da trombospondina esteve associada com pior grau histológico, invasão vascular, fraca expressão protéica da trombospondina e menor sobrevida, na análise univariada (GUERRERO et al. 2008). YANAGAWA et al. (2008) avaliou a hipermetilação de oito genes e sua associação com HPV-DNA em 25 amostras de câncer de pênis. As frequências de hipermetilação encontradas foram 28% para o gene DAPK, 92% para o gene FHIT, 20% para o gene MGMT, 4% para o gene p14, 24% para o gene p16, 24% para o gene RAR- beta, 12% para o gene RASSF1A e 44% para o gene RUNX3. A expressão da proteína Fhit foi negativa em 22 de 25 casos (88%), sendo que desses 22 casos, 20 mostraram metilação do gene FHIT e apenas 12% de todos os 25 casos foram HPV-DNA positivos, levantando a possibilidade para um papel do gene FHIT na patogênese do carcinoma de células escamosas de pênis.

Ainda se sabe pouco sobre o papel dos marcadores moleculares e genéticos no carcinoma de pênis. Trata-se de um tumor raro em países desenvolvidos e se espera que a pesquisa desses marcadores em países onde esta neoplasia é um problema de saúde pública traga uma maior compreensão de vários aspectos relacionados a carcinogênese desta neoplasia

2.3 INVOLUCRINA

A epiderme é uma estrutura dinâmica em constante renovação que provê proteção para sustentar a vida das agressões do ambiente. O tipo de célula principal

da epiderme, o queratinócito epidérmico, apresenta um programa cuidadosamente coreografado de diferenciação. Alteração destes resultados de eventos leva a uma variedade de doenças debilitantes e ameaçadoras da vida. Entender como este processo é regulado é uma meta importante. A regulação do gene da involucrina, serve como um modelo para entender os mecanismos que regulam o processo de diferenciação. Os conhecimentos atuais sobre o papel de fatores de transcrição e cascatas de sinalização na regulação da expressão de gene de involucrina são bastante complexos. Estes estudos descrevem uma cascata de sinalização que incluem as novas isoformas de proteínas cinase C, Ras, MEKK1, MEK3, e um sinal extracelular p38 δ regulada pelo complexo cinase 1/2. Esta cascata regula a proteína do ativador 1, Sp1, e CCATT/ proteína ampliadora de sinal de fator de transcrição de DNA que liga a duas regiões do promotor de involucrina, as regiões regulatórias, a distal e proximal para regular a expressão deste gene (ECKERT et al. 2004).

Queratinócitos são as células principais responsáveis pela estrutura da epiderme. Eles começam como “Stem cell” na camada epidérmica basal (COTSARELIS et al. 1989; LI et al. 1998; TAYLOR et al. 2000; ALONSO e FUCHS 2003; GAMBARDELLA e BARRANDON 2003). As medidas que as células se movem para a superfície epidérmica, as células cessam a divisão celular e sofre mudanças morfológicas para formar as camadas espinhosa, granular, transição e cornificadas. Células da camada espinhosa são caracterizadas pela presença de extensas conexões desmossômicas intercelulares, enquanto que células das camadas granulares são distinguidas pela presença de grânulos que contêm o produtos da diferenciação de queratinócitos. A diferenciação continua das camadas granulares resultam em formação da zona de transição que separa as camadas mortas das camadas vivas da

epiderme. Esta é uma zona em que os componentes celulares são extensivamente e enzimaticamente remodelados. Esta remodelagem resulta no final das contas na formação da camada cornificada, com ligações cruzadas covalentes terminalmente diferenciada de corneócitos que formam a superfície da pele (GREEN 1980).

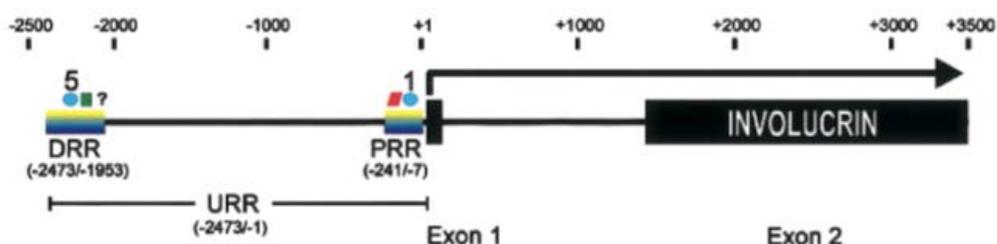
Realizar estas alterações morfológicas requer a execução de um programa prefixado de diferenciação que exige regulação rígida da expressão gênica. O gene de involucrina representa um modelo para elucidar os mecanismos que guiam a expressão gênica durante a diferenciação (ECKERT e GREEN 1986; ECKERT et al. 1997a). Involucrina (hINV) é um precursor de 68 kDa do envelope cornificado que foi descrito originalmente por RICE e GREEN (1979) e finalmente clonado por ECKERT e GREE (1986). A proteína tem forma de bastão e inclui vários resíduos de glutamina reativos que atuam na formação da união de isopeptídeos covalentes (YAFFE et al. 1992; ECKERT et al. 1993; ROBINSON et al. 1997; LAZO e DOWING 1999; STEINERT e MAREKOV 1999; KAJAVA 2000). A Involucrina apresenta ligação cruzada precoce na formação do envelope cornificado e forma um andaime para a incorporação de outros precursores (RICE e GREEN 1979; ECKERT et al. 1993; STEINERT e MAREKOV 1997). A expressão de Involucrina ocorre na camada espinhosa precoce e é mantido na camada granular. Na zona de transição, a involucrina é incorporada, pela ação de transglutaminase, como um componente do envelope cornificado (YAFFE et al. 1992; ECKERT et al. 1993; ROBINSON et al. 1996).

Durante o processo de diferenciação, numerosos genes são ativados e desativados em estágios específicos (ECKERT e WELTER 1996; ECKERT et al. 1997b). O estudo da expressão do gene de Involucrina identificou alguns

mecanismos chaves por meio dos quais cascatas de sinalização intracelular e fatores de transcrição regulam expressão de gene diferenciação-dependente. Além disso, estes estudos esclareceram os mecanismos por meio dos quais uma variedade de agentes, incluindo cálcio (BIKLE et al. 2001; DEUCHER et al. 2002), vitamina A (POUMAY et al. 1999), Proteína cinase C (PKC) ativadores (WELTER et al. 1995), e antioxidantes (BALASUBRAMANIAN et al. 2002), regulam a diferenciação de queratinocitos.

2.3.1 Região Promotora da Involucrina – A Região Regulatória Distal (DRR)

Estudos iniciais em camundongo transgênico revelou que um segmento de 6 kb de DNA codifica o gene estrutural hINV e 2,5 kb de DNA a montante do local de início da transcrição, poderia controlar a expressão adequada do gene hINV na epiderme (CRISH et al. 1993) (Figura 1).



Fonte: Adaptado de ECKERT et al. (2004).

Figura 1 - Representação esquemática do Gene da Involucrina e sequência da regiões regulatórias.

Sua expressão foi observado em todos os epitélios estratificados escamosos que foram testados, incluindo ectocérvice, esôfago, epiderme, sola do pé, e segmentos específicos do folículo piloso. Não foi observado expressão na endocérvice, cérebro ou fígado (CRISH et al. 1993). Além disso, a expressão foi diferenciação específica (ou seja, confinado à camada suprabasal em cada tecido). O padrão de expressão corresponde essencialmente ao padrão observado em tecidos humanos. Além disso, a expressão da proteína involucrina humana foi encontrada incorporada como um componente do envelope murino cornificado, indicando que ela estava funcionando como um substrato transglutaminase (CRISH et al. 1993).

Com base nestes estudos, foi feita a hipótese de que as seqüências de DNA necessárias para a expressão apropriada estava localizada dentro do segmento de 2.500 nucleotídeos a montante do sítio de iniciação da transcrição. Caracterização desta região, chamada de região de ultra-regulação (URR), foi realizada utilizando cultura de queratinócitos e ensaios de luciferase (WELTER et al. 1995). Estes estudos identificaram, no URR, segmentos específicos do DNA chamadas de regiões regulatórias distal e proximal (DRR, PRR), que são necessários para a atividade do promotor (Figura 1). Deleção da região DRR, (nucleotídeos 2473/1953) resulta em uma perda de 50% da atividade do promotor e deleção adicional da PRR (241/7) resultando em uma perda adicional de tal forma que inativa o promotor. Um achado importante deste estudo é a presença de um ativador de proteína (AP1), fator de transcrição de sítios de ligação em cada local (Figura 1). Estudos posteriores revelaram que a mutação de qualquer sitio AP1, AP1-5 no DRR ou AP1-1 no PRR, resulta em uma perda substancial da atividade transcricional. Além disso, estudos de interação de DNA/proteínas confirmam que os fatores selecionados AP1, incluindo

JunB, Jund, e Fra-1, interagem nesses locais (WELTER et al. 1995). Além disso, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) dependente, aumenta durante a atividade do promotor hINV e está associada com aumentada interação do fator AP1 nos sítios AP1-1 e AP1-5 (WELTER et al. 1995).

É importante notar que outros sítios AP1, presente na URR, não funcionam na regulação do gene. Assim, apenas sítios selecionados AP1 na URR são funcionais. Estudos adicionais confirmam que a atividade do promotor hINV é célula-específica, como a atividade do promotor e da expressão da proteína hINV são observadas em queratinócitos humanos normais mas não em cultura de fibroblastos (WELTER et al. 1995).

A análise da seqüência ao redor do local AP1-5 no DRR revelou a presença de um sítio canônico Sp1, localizado imediatamente a jusante do sítio AP1 e separada do site AP1 por um único nucleotídeo (CRISH et al. 1998).

Fatores de transcrição Sp1 compreendem uma família de proteínas, incluindo o SP1, SP2, SP3 e SP4. Estas proteínas contêm um domínio de ligação DNA conservado composto por três “zinc fingers” perto dos domínios C-terminal e serina/treonina ricos em glutamina na região N-terminal (APT et al. 1996; SUSKE 1999). Os fatores Sp1 atuam pela ligação a elementos “G-rich”, semelhante à sítio “G-rich” localizado adjacente à AP1-5 no DRR promotor do hINV. Desde que AP1 e fatores Sp1 funcionam como co-reguladores em outros sistemas (WU et al. 2003), se suspeita que este sítio SP1 pode ser necessário, com o sítio AP1-5, para a expressão adequada do gene hINV. Uma comparação entre o papel desses sítios revela que a mutação do sítio AP1-5 resulta em uma perda completa da atividade do

promotor, ao passo que a mutação no sítio Sp1 resulta em uma redução parcial da atividade (BANKS et al. 1998).

Estudos de mobilidade em Gel mostram que o SP1, mas não o SP2, SP3 ou SP4, ligam no sítio Sp1. A ligação seletiva de Sp é um achado interessante, pois Sp1, entre os membros da família Sp1, é geralmente considerado como um ativador de transcrição (SUSKE 1999), que freqüentemente atua em sinergia com outras proteínas para aumentar a expressão gênica (COUREY e TJIAN 1988; COUREY et al. 1989; PASCAL e TJIAN 1991). Desta forma se supôs que o SP1 pode cooperar com os fatores AP1 que se ligam ao sítio AP1-5. De fato, estudos mutagênicos sugerem que estes sítios agem em conjunto para sinergicamente ativar o promotor (BANKS et al. 1998). A importância da justaposição da AP1-5 e sítios Sp1 foi confirmada, mostrando que a crescente distância entre estes sítios resulta em uma redução na atividade do promotor (BANKS et al. 1998).

Além disso, fatores Sp1 podem ter um papel na regulação da expressão de involucrina do tipo células específicas. A involucrina não é normalmente expressa em células não-epiteliais (RICE e GREEN 1979). Além disso, a ativação do promotor hINV não é observado em células 3T3 ou HEK-293 (não-epiteliais), no entanto, a superexpressão do SP1 em células 3T3 ou HEK-293 resulta em um aumento substancial tanto da hINV endógena como da atividade do promotor hINV (BANKS et al. 1999). Assim, o nível Sp1 influencia profundamente a expressão da Involucrina, sugerindo que fatores Sp1 pode ajudar a expressão seletiva direta de tipos celulares e teciduais específicas. Além disso, a redução da concentração efetiva de SP1 em queratinócitos humanos normais reduz a atividade do promotor hINV

(BANKS et al. 1999). Assim, o SP1 tem um papel importante como regulador da expressão gênica do hINV.

Estudos recentes em camundongos transgênicos (ADHIKARY et al. 2005) revelam que, diferentemente da perda parcial de expressão observada em outros tecidos, a mutação dos sítios específicos Sp1 resultam em uma perda completa da atividade do promotor hINV no epitélio corneano. Isto sugere que o SP1 desempenha um papel mais importante no epitélio corneano do que em outros tecidos epiteliais de superfície, e é consistente com um papel demonstrado de fatores Sp1 na regulação da expressão gênica na córnea (WU et al. 1994).

2.3.2 A Região DRR é necessário e suficiente para expressão normal de hINV “In Vivo”

Estudos prévios identificaram um papel importante para a região do DRR, e especificamente o DRR AP1-5 e sítios Sp1 na regulação da expressão gênica do hINV. A importância desta região foi examinada em detalhe utilizando camundongos transgênicos. Uma série de deleção do promotor foi projetado e cada componente foi testado. Estes experimentos mostraram que a supressão da DRR elimina a expressão transgene do hINV na epiderme e outras superfícies epiteliais (CRISH et al. 1998). Além disso, uma descoberta notável é que uma região específica do DRR, DRR 2473 / 1953 (Figura 1), quando ligado ao promotor basal hINV, é suficiente para produzir diferenciação apropriada tecido-específica na epiderme (CRISH et al. 1998).

Outros estudos transgênicos revelaram múltiplas funções adicionais para o DRR. Como mencionado acima, o DRR 2473/1953 coordena diferenciação

apropriada tecido-específica quase normal. Isto sugere que os elementos desta região podem mediar a expressão em determinadas camadas da epiderme. CRISH et al. (2002), examinaram esta região segmentando o DRR em dois subfragmentos, DRR 2473/2100 e DRR 2100/1953, e testando a capacidade de cada unidade de direcionar à expressão em camundongos transgênicos. O segmento a jusante, DRR 2100/1953, não causa expressão na epiderme. O segmento a montante, DRR 2473 / 2100, em contraste, causa expressão, mas apenas nas mais altas camadas suprabasais (CRISH et al. 2002). Recombinação desses elementos, recupera o padrão completo diferenciação-dependente de expressão. Estes resultados demonstram que o DRR é composto de elementos espacialmente distintos, cada um dos quais é necessário a expressão diferenciação específica.

Esse achado é consistente com a hipótese do promotor modular, que afirma que vários segmentos de DNA espacialmente distintos, contém distintos sítios de ligação a fatores de transcrição, montando um complexo de proteínas reguladoras que dirige a expressão do gene apropriado. O complexo multiproteína em seguida, interage com o maquinário de transcrição basal (HADCHOUËL et al. 2003; OGATA et al. 2003).

A mutação do sítio AP1-5, na ausência de outras mutações nos DRR, resulta em uma perda total de expressão na epiderme, esôfago e colo do útero (CRISH et al. 2002), sugerindo que a presença de fatores AP1 são necessários para a expressão. Além disso, a mutação neste sítio no contexto do promotor completo também resulta em uma perda total de expressão nestes tecidos, apontando para um papel fisiológico “in vivo” para esse sítio. Análise de mobilidade em gel dos extratos retirados da epiderme do rato sugere que c-Jun e Fra-1 interagem neste sítio (CRISH et al. 1998).

Este perfil obrigatório do fator AP1 é um pouco diferente daquela observada em extratos preparados a partir de queratinócitos humanos, onde JunB, Jund, e Fra-1 são as principais proteínas de interação (WELTER et al. 1995), e sugere que a expressão pode ser obtida por diferentes fatores AP1 em ratos versus epiderme humana. Apesar dos estudos que mostram que o DRR é suficiente para conduzir a expressão diferenciação-específica, a região do PRR também desempenha um importante papel regulador.

2.3.3 Caracterização da PRR

A PRR está contido em nucleotídeos 241/7 e é marcada pela presença do sítio AP1-1 e um CCAAT / proteína amplificada de ligação (C / EBP) sítio de ligação de fator de transcrição (WELTER et al. 1995) (Figura 1). Como já observado, a mutação do sítio AP1-1, que liga seletivamente JunB, Jund, e Fra-1, resulta em uma queda de 50% na atividade transcricional (WELTER et al. 1995). Outros pesquisadores também identificaram um papel para o sítio AP1-1. MONZON et al (1996) relataram que os glicocorticóides aumentam a atividade do promotor hINV e que este aumento é inibido pelo tratamento com ácido trans-retinóico ou ácido 9-cis-retinóico. Esta resposta é mediada através do sítio AP1 PRR-1. Também se observou que a ativação do promotor TPA-dependente hINV através do site AP1-1 é reduzida em tratamento com co-retinóide (MONZON et al. 1996).

O sítio C/EBP também desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica do hINV. Mutação dos sítios C/EBP resulta em uma redução na atividade basal do promotor e uma diminuição da resposta do promotor para o tratamento de células com agentes de diferenciação (AGARWAL et al. 1999). Além

disso, fatores de transcrição individuais C/EBP diferencialmente regulam a atividade do promotor. Em contraste com outros fatores de C/EBP, que são reguladores menos eficientes da atividade do promotor, C/EBPa se liga ao promotor e aumenta a atividade. Regulação C/EBP-dependente pode ser complexa, uma vez que fatores C/EBP interagem em diferentes combinações que podem produzir diferentes resultados regulatórios (ROSEN 2002; CASSEL e NORD 2003). Na verdade, esse é o caso de hINV, como co-expressão de C/EBPb e C/EBPd com C/EBPa, suprimir a ativação C/EBPa promotor-dependente. Isto sugere que a relação entre os fatores C/EBP presentes dentro da célula podem ajudar a determinar o nível de expressão do gene hINV. Da mesma forma, GADD153, um fator de transcrição dominante negativo C/EBP (BARTLETT et al. 1992; FAWCETT et al. 1996), inibe o aumento de C/EBPa-dependente na atividade do promotor hINV (AGARWAL et al. 1999). Estudos de mobilidade em Gel indicam que o tratamento com o agente de diferenciação dos queratinócitos TPA, que aumenta a expressão do gene hINV, aumenta o quantidade C/EBPa no sitio de ligação do promotor C/EBP vinculado ao hINV. Assim, o aumento da atividade transcricional está associado com o aumento da ligação da C/EBPa ao DNA. Finalmente mutação, dos sítios C/EBP resultam em uma perda de atividade do promotor TPA-dependente, confirmando o papel do C/EBP como ativador transcricional positivo (AGARWAL et al. 1999).

O tratamento com taspigargina, um agente de mobilização de cálcio intracelular (THASTRUP et al. 1989, 1990), inibe o aumento da atividade TPA-dependente do promotor hINV de forma C/EBP-dependente. Esse resultado é surpreendente, já que com o aumento do cálcio intracelular seria esperado aumento da expressão gênica do hINV (DEUCHER et al. 2002). Mas este efeito parece ser

devido à capacidade não-específica da taspigargina para reduzir a quantidade de fator C/EBP vinculada ao sítio de ligação C/EBP do promotor do hINV (BALASUBRAMANIAN et al. 2000).

2.3.4 Modelo de Regulação do Gene da Involucrina

Com base nos resultados desses estudos, ECKERT et al. (2004) propôs um modelo para a regulação da expressão gênica da Involucrina através de elementos DRR e PRR (Figura 2).

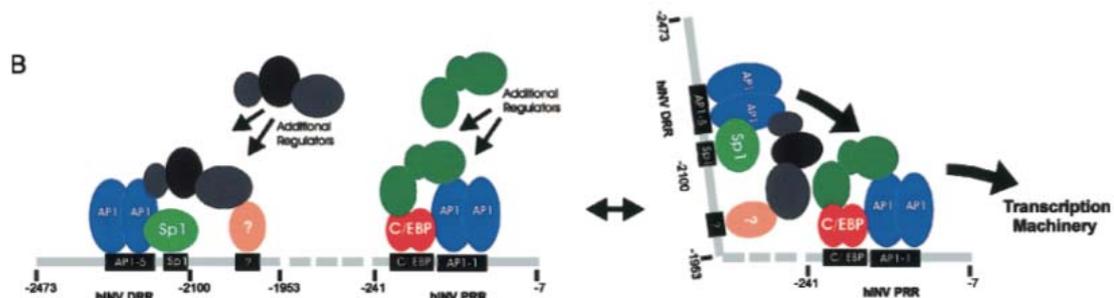


Figure 1

Fonte: ECKERT et al. (2004).

Figura 2 - Esquema da Cooperação da Região regulatória Distal e da Região regulatória Proximal para a expressão gênica apropriada.

Neste modelo, os fatores de transcrição de carregam sítios AP1-1 e Sp1 na DRR seguido por carregamento de proteínas adaptadoras. Ligação de três sítios essenciais, a AP1-5 e Sp1 no seguimento DRR 2473 / 2100, e ao sítios suprabasais imediatos no seguimento DRR 2100 / 1953, é necessário para o programa completo da transcrição diferenciação específica. O sítio AP1-5 funciona como um interruptor “on-off”, o sítio Sp1 coopera com sítio AP1-5 sinergicamente para ativar a

expressão, e os sítios imediatos suprabasais são necessários para a expressão nas camadas suprabasais imediatas (CRISH et al. 1998).

Ativação de fator de transcrição também ocorre na AP1 PRR-1 e sítios C/EBP. C/EBPa liga no sítio C/EBP (AGARWAL et al. 1999) e JunB, JunD, e Fra vicular-1 no sítio AP1 (WELTER et al. 1995). Esta ligação é, presumivelmente, seguido pela ligação de proteínas co-regulatórias, tanto no sítio DRR como no sítio PRR. Uma vez que ambos os sítios são necessários para a expressão apropriada “in vivo”, se especula que o DNA se dobra (TOLHUIS et al. 2002; OGATA et al. 2003) para trazer a região DRR e regiões PRR em justaposição e esse complexo conjunto, em seguida, interage com o maquinário basal de transcrição para dirigir a transcrição diferenciação-dependente.

2.4 DESMOSSOMOS

Proteínas desmossômicas são marcadores bem estabelecidos de diferenciação epitelial. Diminuição da regulação de proteínas desmossômicas tem sido sugerida como um sinal de redução na adesividade em células metastáticas (KURZEN et al. 2003).

Em queratinócitos epidérmicos os principais sistemas de adesão célula-célula são as junções aderentes e os desmossomos (KURZEN et al. 2003). Estudos prévios sugerem que a redução na adesão célula-célula observada em carcinomas espinocelulares pode estar associada a habilidade de metástase e invasão das células tumorais. Apesar de dados convincentes a respeito de proteínas de aderências juncionais, para diferentes entidades, dados conflitantes tem sido apresentados por

anticorpos inespecíficos para proteínas desmossômicas. Desmossomos são junções adesivas intercelulares que conectam as citoqueratinas à membrana celular. Desmogleínas (Dsgs) e Desmocolinas (Dscs) são as principais proteínas desmossômicas transmembrana. Elas pertencem a família das caderinas de moléculas de adesão celular cálcio dependente (CHIDGEY e DAWSON 2007).

Várias isoformas diferentes de Dsg e Dsc chamadas Dsg 1-4 e Dsc 1-3 podem ser identificadas. A suas porções citoplasmática estão associadas a uma variedades de proteínas de placas, incluindo as comuns a elas como desmoplakina I (DP) e plakoglobina (PG) e também a células tipo específicas como a DP II e a plakofilina (PKP) 1 - 4. As caderinas desmossomais mostram expressão diferenciação-específica no epitélio e podem também servir em adição a citoqueratinas bem estabelecidas, como sistema independente de marcadores de diferenciação (CHIDGEY e DAWSON 2007).

2.4.1 Regulação da estrutura desmossômica e adesão

Os desmossomos são junções intercelulares altamente organizadas que promovem integridade mecânica aos tecidos pela ancoragem de filamentos intermediários a sítios de aderências fortes. Regulação transcricional das caderinas desmossômicas específica seu padrão de expressão e organização em junções de composições distintas, conferindo as funções desmossômicas de adesão e morfogênese em diferentes células e tecidos complexos. A organização e desorganização desmossômica são reguladas pós-transducionalmente por cálcio, atividade cinase/fosfatase, processamento proteolítico e relação cruzada com junções de aderências (YIN e GREEN 2004; CHIDGEY e DAWSON 2007).

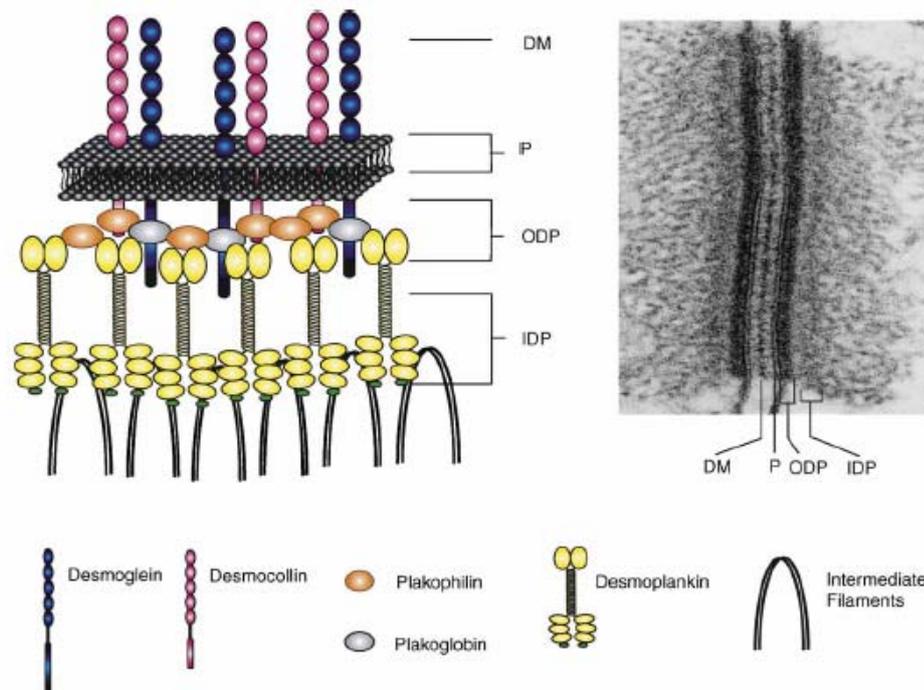
Eventos pós-transducionais também governam o nível de formas não juncionais de plakoglobina, e plakofilina. Estas proteínas “Armadillo” participam de várias funções nucleares, em alguns casos traduzindo sinais de regulação do ciclo celular e diferenciação (YIN e GREEN 2004; CHIDGEY e DAWSON 2007).

2.4.2 Composição desmossômica, estrutura e função

Os desmossomos pertencem a uma classe de junções especializadas chamadas “junções de ancoragem” que acoplam elementos do cito-esqueleto a membrana plasmática na adesão célula-célula ou adesão célula-substrato. Enquanto as junções aderentes relacionadas associam-se com microfilamentos da interface célula-célula, desmossomos são confeccionados para ancorar filamentos intermediários resistente a stress (IFs) nos sítios de adesão intercelular forte. O esqueleto supra-celular resultante desempenha um papel chave em promover integridade mecânica aos tecidos como epiderme e coração que experimentam stress mecânico. Entretanto estes “rebites” são estruturas dinâmicas sujeitas à sinais regulatórios transcricionais e pos-transducionais e também participam na morfogênese tecidual e diferenciação (YIN e GREEN 2004).

2.4.3 Estrutura e Composição Molecular

Desmossomos compreende proteínas de pelo menos três famílias gênicas diferentes: caderinas; proteínas “Armadillo” e plakinas. (HUBER 2003; GETSIOS et al. 2004) (Figura 3)



Fonte: Adaptado de YIN e GREEN(2004)

Figura 3 - Modelo ultra-estrutural e molecular dos Desmossomos.

As caderinas desmossômicas, são divididas em desmogleínas (Dsg 1-4) e desmocolinas (Dsc 1-3) (GARROD et al. 2002; KLJUIC et al. 2003; WHITTOCK 2003). Membros de ambas as subfamílias são glicoproteínas trans-membrans isoladas que mediam a adesão célula-célula dependente de Ca^{2+} . “Splicing” alternativo das desmocolinas resultam nas formas longa e curta, chamadas “a” e “b”, respectivamente. As proteínas “Armadillo” incluem plakoglobina, a plakofilina (PKP1-3), e p0071 (HATZFELD 1999; CHEN et al. 2002; BONNE et al. 2003; CALKINS et al. 2003). A família de proteínas plakinas incluem desmoplankinas I e II, plectina, e as proteínas de envelope celular, envoplakina e periplakina (LEUNG et al. 2002).

Ensaio de ligação “in vitro”, ao longo de um mapa de alta resolução de desmosomos obtidos por microscopia imuno-eletrônica, suporta um arranjo de proteínas similar a aquelas demonstradas nas junções aderentes (NORTH et al. 1999) Figura 1. Em ambos os casos uma extremidade da caderina se liga a um membro da família “Armadillo” (β -catenina/plakoglobina em junções aderentes ou plakoglobina em desmosomos.), a qual em termos, se associa com proteínas de ligação do citoesqueleto (α -catenina nas junções aderentes e desmoplakina nos desmosomos). Enquanto os dois primeiros se ligam a cadeias protéicas, em cada caso, é da mesma família gênica, a ligação final diverge para acomodar requerimentos funcionais especiais para actina de ancoragem nas junções aderentes e filamentos intermediários resistentes a stress nos desmosomos. Para os desmosomos a existência de interações proteínas-proteínas adicionais sugere que este modelo linear é insuficiente para descrever sua arquitetura. As plakofilinas se ligam não somente as caderinas desmosômicas e desmoplakina, mas também a plakoglobina (PKP2) e proteínas de filamentos intermediários (PKP2 e 3) (BONNE et al. 1999; CHEN et al. 2002). Além disso, certas caderinas desmosômicas interagem com desmoplakinas em uma forma plakoglobina-independente (TROYANOVSKY et al. 1994; SMITH e FUCHS 1998; BORNSLAEGER et al. 2001). Ainda mais, cada proteína na placa desmosômica age como um nodo para múltiplos pontos de contato com outros parceiros, um arranjo que pode proporcionar grande resistência tênsil a estas junções.

2.4.4 A placa desmosômica:

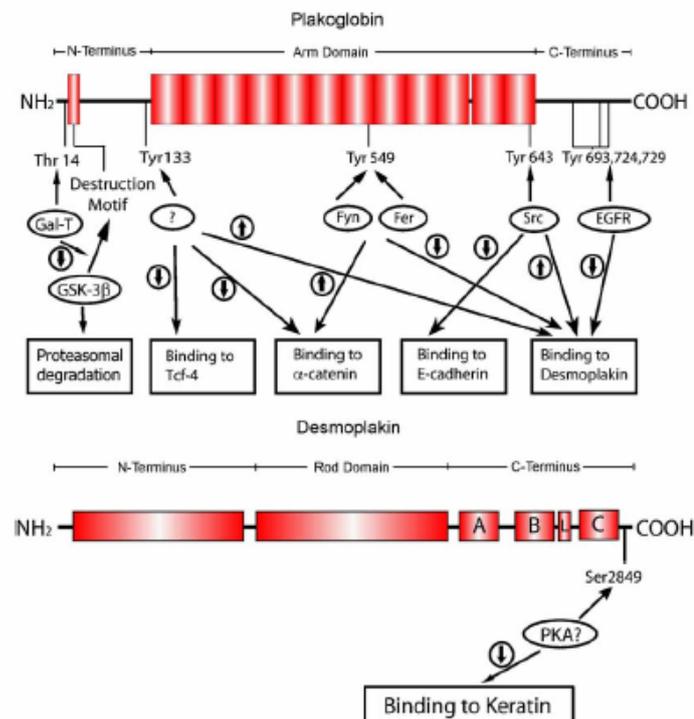
Dentro da placa citoplasmática, proteínas “Armadillo” participam da regulação da organização desmosômica e adesão. Co-expressão de plakoglobina foi

mostrada ser necessária para adesão robusta de fibroblastos expressando desmocolina 2 (Dsc2) e desmogleina 1 (Dsg1) (MARCOZZI et al. 1998) e sua perda em, animais “null” leva a mistura de junções aderentes e desmossomos, defeitos de adesão e fragilidade tecidual. (RUIZ et al. 1996) A expressão de plakoglobina C-terminal truncada resulta na formação de desmossomos longos, sugerindo que este domínio pode limitar o tamanho da junção pela regulação da interação proteína-proteína (PALKA e GREEN 1997). A plakoglobina e as Plakofilinas colaboram com a porção N-terminal da desmoplakina para regular aglomerados de caderinas desmossomal, e todas são necessárias para formar uma placa desmossomal reconhecível ultra - estruturalmente (BORNSLAEGER et al. 2001; KOWALCZYK et al. 1997; KOESER et al. 2003).

A relativa habilidade dos membros da família das plakofilinas para recrutar desmoplakinas varia, tanto quanto a sua distribuição tissular e superpõe o repertório dos parceiros de ligação, desta forma, parece possível que estas proteínas “Armadillo” devem estar envolvidas na organização desmossômicas para funções celulares específica.

A presença da desmoplakina na placa é crítica. Como este membro da família das plakinas é absolutamente necessária para ancoragem adequada dos filamentos intermediários ao desmossomo, que em termos, é importante para formar adesões resistentes e para a integridade tecidual. (HUEN et al. 2002) Enquanto a porção “N-terminal de proteínas Armadillo” liga domínios alvos da desmoplakina com a membrana, a C-terminal é um domínio de ligação dos filamentos intermediários que esta associado a vimentina, desmina e queratinas e regula a afinidade da ligação com o citoesqueleto. (STAPPENBECK e GREEN 1992; STAPPENBECK et al. 1994;

KOUKLIS et al. 1994; MENG et al. 1997; FONTAO et al. 2003) Análise estrutural de alta resolução deste domínio de ligação de filamentos intermediários identificou um sulco na superfície dos domínio repetitivos da plakina B e C que pode oferecer um sítio de ligação dos filamentos intermediários (CHOI et al. 2002) (Figura 4).



Fonte: Adaptado de YIN e GREEN(2004)

Figura 4 - Representação esquemática da interação da Plakoglobina e Desmoplakina pela fosforilação protéica.

Entretanto, alguns estudos tem relatado a importância de ligação interveniente e a seqüência terminal tanto na ligação como na regulação da ligação de tipos celulares específicos com os filamentos intermediários (FONTAO et al. 2003). Apesar das plakinas desmossômicas poderem contribuir para a ancoragem de filamentos intermediários, a ablação da envoplakina em camundongo não é contrariamente comparado com a letalidade embrionica observado em camundongo

“nock out” para desmoplakina, resultando apenas em um pequeno atraso na aquisição de barreira (GALLICANO et al. 1998; MAATTA et al. 2001). Além disso, modelos de doenças humanas e de ratos sugerem que plectina desempenha um papel mais importante em hemi-desmossomos, que são estruturas de adesão célula-substrato (WICHE 1998).

2.4.5 O Núcleo Adesivo

Enquanto a estrutura da placa desmossômica está longe de ser desvendada em todos os detalhes, a estrutura da interface adesiva extra-celular representa um desafio ainda maior (GARROD et al. 2002). Estudos cristalográfico e bioquímico dos clássicos domínios caderínicos sugerem que eles formam dímeros homofílicos em orientação *cis* e *trans*. A ligação de cálcio a domínios extracelulares é importante para enrijecer sua estrutura e para sua função (PERTZ et al. 1999). Enquanto a dimerização *trans* é necessária para formar interface adesiva com células adjacentes, tem sido proposto que dimerização *cis* é importante para promoção de adesão via grupamentos moleculares.

Desde que resíduos críticos dos domínios extra-celular que media a dimerização na caderina clássica são altamente conservados nas caderinas desmossômicas, parece que desta forma as caderinas desmossômicas podem também dimerizar em *cis* e/ou em *trans*. Entretanto, determinar interações para caderinas desmossômicas tem sido complicada pela complexidade da família de gene e pelo número de possíveis interações homo e heterofílicas que podem existir.

Consistente com a importância de ambas as caderinas desmossômicas para a função adesiva, co-expressão de Desmocolina e Desmogleina é necessária para uma

adesão robusta de fibroblasto em ensaios de agregados em suspensão (AMAGAI et al. 1994; KOWALCZYK et al. 1996; MARCOZZI et al. 1998; TSELEPIS et al. 1998) Também, enquanto um único peptídeo de bloqueio de adesão foi suficiente para inibir a adesão clássica mediada por caderina, ambos peptídeos específicos para Desmogleina e Desmocolina foram necessários para bloquear a adesão desmossômica (TSELEPIS et al. 1998; RUNSWICK et al. 2001). Estas evidências apóiam a idéia de que caderinas desmossômicas exibem uma preferência para a formação de complexo heterofílico cálcio-dependente, e que estes complexos são importantes para adesão intercelular forte.

Tomografia eletrônica, recentemente vislumbrou como a interface caderina desmossomal se parece “in situ”. A imagem revelou que moléculas distintas de caderinas de grupos distintos interagem pelas suas extremidades, incluindo as interações *cis* e *trans* (HE et al. 2003).

2.4.6 Função Desmossômica

Desmossomos são conhecidos como rebites intercelulares que mantêm as células aderidas e mantêm a resistência desta adesão. Este papel é apoiado por um número de doenças humanas e modelos murinos nos quais as proteínas desmossômicas são afetadas por mutação gênica, anticorpos auto-ímmunes, ou toxinas bacterianas. As características comuns destas doenças é a fragilidade epitelial e vesículas, especialmente na presença de estresse mecânico.

A função da desmogleina pode ser inibida por inúmeras vias. Na doença auto-ímmune “*phemfigus vulgaris*, anticorpos diretamente contra a desmogleina 3 resulta em vesículas da membrana da mucosa oral onde esta caderina predomina, um

fenótipo que é espelhado por um camundongo “nock out” para desmogleina 3 (KOCH et al. 1997). No caso do “phemfigus foleaceus”, anticorpo anti-desmogleina 1 resulta em vesículas nas camadas superficiais da epiderme onde é expressa (AMAGAI 1999). Este fenótipo também é visto em pacientes com infecção por *Staphylococcus aureus* em que protease sérica bacteriana (chamada toxina exfoliativa) especialmente quebra a desmogleina 1, causando sua inativação via diferentes mecanismos, mas com o mesmo resultado (AMAGAI et al. 2000, 2002; HANAKAWA et al. 2003).

Fragilidade cutânea também é visto em pacientes com mutação em desmogleina 1 da mesma forma que o componente da placa desmoplakina, plakoglobina e PKP1. Interessantemente, em alguns casos estas mutações são acompanhadas por miocardiopatias devido ao resultado do estresse pelas células do músculo cardíaco com adesões fracas (MCGRATH 1999; MCMILLAN e SHIMIZU 2001).

Desmossomos também participam na embriogênese e morfogênese de estruturas adultas, possivelmente através de mecanismos que não são estritamente dependentes de suas funções adesivas. Pacientes portadores de mutações em proteínas desmossômicas também podem apresentar defeitos no desenvolvimento capilar, resultando em cabelos curtos e ondulados semelhantes a “lã de carneiro” em pacientes com mutação em genes da desmoplakina ou plakoglobina (MCKOY et al. 2000; NORGETT et al. 2000; RAMPAZZO et al. 2002; ALCALAI et al. 2003) e pacientes com cabelos encravados na mutação da desmogleina 4. Perda tanto da desmoplakina como da desmogleina 2 em camundongo resulta em letalidade embriônica precoce, e desmogleina 2 parece ser necessária para sustenta certas

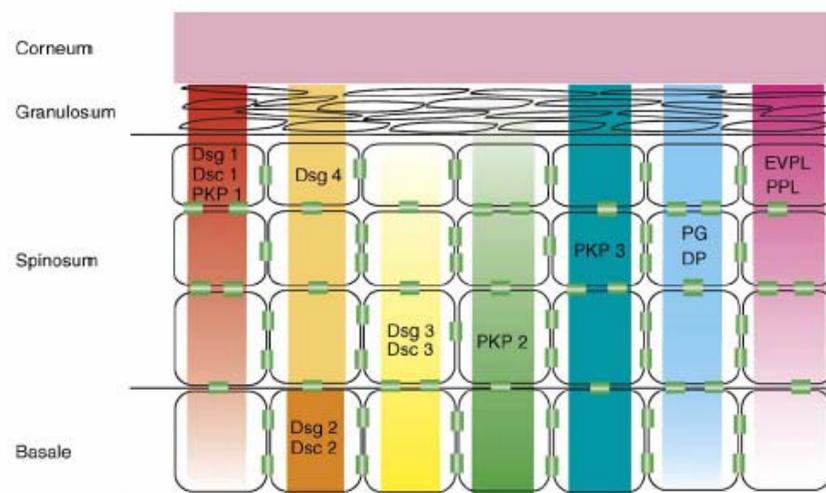
células em culturas sugerindo seu envolvimento com o controle do crescimento (GALLICANO et al. 1998; ESHKIND et al. 2002). Juntas estas observações sugerem que os desmossomos não são apenas essenciais na manutenção da integridade tecidual, mas também desempenham papéis na morfogênese no embrião precoce e apêndices da pele adulta.

2.4.7 Regulação Desmossômica e Remodelamento durante Desenvolvimento e Diferenciação

Acredita-se que o padrão temporal de expressão de componentes dos desmossomos é um regulador fundamental de organização dentro do embrião de rato pre-implantação (FLEMING et al. 2001). Considerando que desmoplakinas aparecem primeiro em mórulas de 16-células, as caderinas desmossômicas não são vistas antes do final no blastócisto precoce, fase no qual são formados os desmossomos. O aparecimento relativamente tardio de desmossomos comparados com junções aderentes e compactas são consistente com um papel de estabilização do “trophectoderme” durante expansão de blastócisto.

No adulto a composição desmossômica e estrutural varia de tipo celular para tipo celular e durante o processo de diferenciação e estratificação em epitélios complexos (Figura 5). Dsg2 e Dsc2 são ubiquitivamente expressa em todos os tecidos que formam desmossomos inclusive todos os epitélios, músculo cardíaco, a meninge arachnoide, e células dendríticas de linfonodos. (NUBER et al. 1995; AKAT et al. 2003). Dsg1 e 3 e Dsc1 e 3, por outro lado, são restritos a epitélios estratificados. Em epiderme, Dsg1 e Dsc1 está concentrado na camada superior altamente diferenciada da pele, enquanto Dsg3 e Dsc3 são proeminentes na camada

basal e Suprabasal (GARROD et al. 2002; GETSIOS et al. 2004). Dsg4 tem uma distribuição tecidual única em glândulas salivares, testículos, e próstata, bem como na pele (WHITTOCK e BOWER 2003). Finalmente, em ratos, mas não em humanos, há três Genes de Dsg1. Cada um é expresso dentro de uma diferente mas, superponível distribuição tecidual, na qual inclui baço de adulto e testículos no caso de Dsg1 α (WHITTOCK 2003; PULKKINEN et al. 2003).



Fonte: Adaptado de YIN e GREEN(2004)

Figura 5 - Padrões de diferenciação-dependente das proteínas desmossômicas na epiderme.

O padrão de distribuição específico de componentes desmossomais não é somente o resultado da diferenciação mas pode na realidade direcionar a morfogênese tecidual e função (GARROD et al. 2002). CHIDGEY et al. (1997) observaram que mudanças no padrão de expressão embrionário de Dsc3, acompanha a organização epidérmica durante desenvolvimento de pele e propõe que a relação de Dsc3 e Dsc1 regula a diferenciação da pele. Semelhantemente, alterando a relação de Dsg3 para Dsg1 na epiderme suprabasal pela expressão forçada de Dsg3 resulta na

aquisição de características de mucosa epitelial, e leva a letalidade perinatal devido a severa perda líquida transepidérmica (ELIAS et al. 2001).

Um modelo murino semelhante que usa um promotor suprabasal diferente para dirigir a expressão de Dsg3 resultou em hiperproliferação epidérmica e diferenciação anormal (MERRITT et al. 2002). O funcionamento adequado dos pares Dsc2/Dsg2 e Dsc3/Dsg3 também provê informação de posicionamento necessária para ordenar tipos diferentes de células e morfogênese de ácinos mamários multicamadas “in vitro” (RUNSWICK et al. 2001). Junto, estes dados enfocam a importância de regulação dos padrões de expressão desmossomal para diferenciação normal e morfogênese.

O entendimento dos eventos transcricionais e pos-transcricional que dirigem a distribuição das caderinas desmossomal dependente de diferenciação esta apenas no começo. O fato de que estas caderinas são organizadas em conjuntos de cooperação no cromossomo 18, abasteceu a especulação de que a expressão delas é coordenadamente regulada. Os promotores para Dsc1, Dsc2, Dsc3, Dsg1 e Dsg3 foram parcialmente caracterizado (HUNT et al. 1999). Dsc 1 e 3 são ambos regulados por famílias de proteínas de ligação CCAAT/ampliado-C/EBP α e C/EBP β , respectivamente, e expressão de ambos os Dscs é ativada por C/EBP δ . Além disso, PKC regula a expressão de Dsg1 sem ter efeitos em outros Dsgs (DENNING et al. 1998). Como as caderinas desmossômicas, plakofilinas também exibem localizações diferenciação-dependentes (Figura 3). Enquanto PKP3 é ubiquitariamente expresso por fora das camadas epidérmicas, PKP1 parece estar presente no desmossomo só em camadas suprabasais e PKP2 diminui gradualmente da camada basal para a superfície (MOLL et al. 1997). A presença de PKP1 em junções das camadas

diferenciadas parece ser regulado pos-transducionalmente, como também está presente dentro do núcleo de células na camada basal.

Eventos pos-transducionais também devem estar envolvidos no remodelamento dos desmosomos a medidas que as células se movimentam para cima nas camadas superficiais da pele (área sobre a qual pouco é conhecido). Se sabe que quando a distribuição das caderinas desmosomais se sobrepõem, ambas as isoformas podem estar presentes dentro de um desmosomo individual (NORTH et al. 1996). A organização e o uso de caderinas e as proteínas associadas a elas deve ser cuidadosamente coordenadas, como foi mostrado que, “in vitro”, a expressão de caderinas desmosomal fora do contexto normal delas pode romper a formação desmosomal (ISHII et al. 2001). Se desmosomos são remodelados pela inserção de isoformas de caderinas recentemente sintetizadas em junções pré-existentes, ou se novas formas de junções que usa misturas de moléculas como construtor de blocos, enquanto desmosomos antigos são internalizados e degradados, ou ambos, não é conhecido. Nesta consideração, recente recuperação de fluorescência depois de análise de “photobleaching” (FRAP), mostrou que GFP-Dsc2 troca em desmosomos alvos com uma meia vida de 30 minutos, sugerindo que as caderinas desmosômicas são capazes de ser trocadas entre desmosomos existente (WINDOFFER et al. 2002).

Durante as fases finais de diferenciação, moléculas desmosômicas servem como substratos para ligamento cruzados mediado por transglutaminase como eles participam na iniciação de organização do envelope celular cornificado (STEINERTE e MAREKOV 1999). Além disso, processos proteolíticos de moléculas desmosômicas como corneodesmosina podem contribuir para a

descamação durante fases posteriores de diferenciação (SERRE et al. 1991; SIMON et al. 2001). Além disso, foi demonstrado que Dsg 1 é um substrato para caspases-3 em queratinocitos e a ativação da caspase-3 foi associada com diferenciação de queratinocitos (WEIL et al. 1999; ECKHART et al. 2000). Junto estas observações sugerem que moléculas desmossômicas sejam ambos participantes ativos na morfogênese epitelial bem como o alvo de enzimas diferenciação-específicas que remodelam queratinocitos durante as fases finais de estratificação e descamação.

2.4.8 Regulagem pós-transducional dos componentes desmossômicos

- **Cálcio:** Aumento do cálcio extracelular dispara a formação de junção “in vitro”, e é provável que ambos os níveis de cálcio extracelular e citoplásmicos sejam importantes para o processo. Os eventos que norteiam a organização juncional são em grande parte pos-transducionais, apesar de que ao decorrer das fases não exija a síntese de novas proteínas. Contato entre células cálcio-induzido faz, entretanto, aumentar a estabilidade metabólica de componentes individuais e resulta na titulação de um detergente solúvel para um grupo de proteínas desmossomal insolúvel, inclusive Dsgs, (PASDAR e NELSON 1989), desmoplakina (PASDAR e NELSON 1988a e b) e plakoglobina (PASDAR et al. 1995a).

O aumento da estabilidade metabólica de componentes das junções mais provavelmente reflete uma cascata de modificações pos-transducionais e a organização de precursores multi-moleculares que acontecem no processo de organização desmossômica. Consistente com a idéia que a estabilidade metabólica de plakoglobina é regulada através de interação com proteínas associadas, a taxa de

degradação da plakoglobina foi diminuído de 15-20 vezes pela co-expressão tanto de Dsg ou Dsc em fibroblastos faltando outras proteínas de junções intercelular (KOWALCZYK et al. 1994). Deleção do domínio de ligação da plakoglobina em Dsg3 prejudica sua incorporação nos desmossomos, sugerindo que a formação do complexo é importante no processo de organização (ANDL e STANLEY 2001).

Várias evidências sugerem que Dscs possam iniciar a organização desmossômica. Em células MDCK cálcio-trocadoras sujeitadas a um bloqueio a temperaturas de 19⁰C, Dsc2 aparece primeiro na superfície de célula, com Dsg sendo transportada para possíveis sítios nucleares durante um segundo estágio (BURDETT e SULLIVAN 2002). A potencial importância de Dsc em estágios precoces da organização desmossômica é apoiada por experiências em queratinocitos HaCat no qual a porção N-terminal deletada de Dsc3 (Dsc3 Δ EC) compromete a formação de junções aderentes e subsequente organização desmossômica, enquanto a Dsg3 com a porção N-terminal deletada (Dsg3 Δ EC) apenas prejudica a formação de desmossomos. Também foi mostrado que Dsc3 Δ EC liga ambos plakoglobina endógena e β -catenina em células de HaCat (HANAKAWA et al. 2000). Levado junto, estas observações eleva a possibilidade que durante formação de contato inicial, Dscs é preferencialmente transportado pelo contato célula-célula onde eles interagem com junções aderentes β -catenin ou plakoglobina, iniciando a nucleação de desmossomos.

Considerando que as caderinas desmossomais e plakoglobina são provavelmente translocada juntas para sítios de contato de célula-célula, possivelmente, através de transporte de vesícula microtubulo-dirigido, desmoplakina parece permanecer em uma área separada durante a organização desmossômica

cálcio-induzido (PASDAR et al. 1991). Desmoplakina contendo pontos luminoso fluorescente associado com filamentos intermediários de queratina no citoplasma de células de baixo nível de cálcio, tem sido interpretado como precursor desmossômico que é translocada para a membrana para organizar a placa (JONES e GOLDMAN 1985). Outros sugerem que eles interiorizam remanescentes desmossômicos (MATTEY e GARROD 1986a; DUDEN e FRANKE 1988). Recentes experiências de imagem de células vivas usando formas GFP-marcadas de desmoplakina demonstram que a translocação de pontos contendo ligação citoplasmática não-membrana para sítios de organização desmossômica. Estes dados apóiam a idéia que pelo menos alguns dos pontos fluorescente são precursores que participam em novos ciclos de formação das junções. O mecanismo por qual este macromolecular são precursoras, são formados o envolvimento de outros componentes da placa como PKPs em sua organização, e como eles são translocadas em células são perguntas que permanecem sem respostas.

Imagens de células vivas usando Dsg2-GFP ou plakoglobina-GFP revelou comportamentos dinâmicos adicionais de desmossomos, em qual estas junções são continuamente organizadas em contatos estáveis que tardiamente se funde em uma única estrutura com desmossomos vizinho. Tal processo resulta em constante remodelamento e redistribuição do número e tamanho de desmossomos, provendo um mecanismo para regular tanto a flexibilidade e estabilidade do complexo filamento intermediário-desmossomo nas células (GLOUSHANKOVA et al. 2003).

Em camadas de células epiteliais que amadureceram durante vários dias, desmossomos sofrem uma transição de cálcio-dependência para cálcio-independência (MATTEY e GARROD 1986b). Dado estas circunstâncias

desmosomos permanecem estáveis até mesmo quando sujeito a baixo nível de cálcio extracelular. Porém, este processo é revertido nas extremidades de feridas em uma camada epitelial, um processo que é dependente de PKC α (WALLIS et al. 2000). A importância de cálcio como um regulador de desmosomos “in vivo”, como também as implicações desta fase de maturação observada, ainda não é entendido, embora um gradiente de cálcio tem sido medido na epiderme (MENON et al. 1985).

2.4.9 Dependência nas junções aderentes

Várias linhas de investigação sugerem que a formação de desmosomos é dependente da organização das junções aderentes acima (HUBER 2003; GETSIOS et al. 2004). Junções aderentes são as primeiras a se formar em resposta a um sinal de cálcio extracelular. Células que expressa componentes de proteína desmosômicas, mas falta uma caderina clássica ou α -catenina, é incapaz de organizar desmosomos. Em um caso, re-expressão de E-caderina foi insuficiente para ativar a organização desmosômica, mas reintrodução de plakoglobina, ou um complexo E-caderina-plakoglobina pode agir como um intermediário importante coordenando a organização destas duas junções (LEWIS et al. 1997). O fato de estruturas “desmosomo-like” formado na pele de plakoglobina de ratos “Knock out” (BIERKAMP et al. 1996) parece contradizer a noção de que plakoglobina é necessária para a organização desmosômica. Porém, é possível que outras moléculas podem colaborar para esta função da plakoglobina, incluindo p0071, β -catenin ou talvez mesmo o PKP2, todos já se mostraram capazes de se associar com ambos as junções aderentes e com componentes de desmosomos (CHEN et al. 2002; HATZFELD et al. 2003). Em outro estudo, ativação de PKC parecia evitar a

exigência por α -catenina em células de carcinoma de cólon que faltam esta molécula, resultando na indução de desmossomos e organização de junções aderentes curtas e recuperação de características de epitélios normais (VAN HENGEL et al. 1997). Assim, junções aderentes podem prover ambos sinais estruturais e químicos importante para a organização de outras junções.

Também foi sugerido que simplesmente seja o ato de manter membranas em contato íntimo tenha como resultado o fechamento da E-cadherin que permita aos desmossomos formar e subseqüentemente manter juntas as membranas adjacentes (VASIOUKHIN et al. 2000). Por outro lado, foi relatado que na ausência de contato célula-célula, placas “meio-desmossomos” com caderinas desmossomal expostas são formados e então rapidamente endocitadas na ausência de uma conexão estável para uma placa associada em uma célula vizinha (DEMLEHNER et al. 1995). Aquelas junções aderentes e os desmossomos têm uma relação simbiótica e é realçado não obstante por dados de um desmoplakina “knoch out” na qual o numero de junções aderentes diminuem e a sua maturação é prejudicada em pele de rato (VASIOUKHIN et al. 2001).

2.4.10 Processamento Proteolítico

Proteínas desmossômicas também são alvos de processos proteolíticos que podem agir para modificar as funções desmossômicas durante o processo de diferenciação, cicatrização de ferida, morte de celular e certos processos patogênicos. Em células sofrendo apoptose, plakoglobina, desmoplakina-1 e 2, bem como plakophilina-1, são todos substratos de caspases em células apoptoticas (BRANCOLINI et al. 1998; WEISKE et al. 2001). Caderinas desmossomais, como

Dsg3, Dsc3 e Dsg1, não apenas são clivadas através de caspases em seus domínios intracelulares, mas também são clivadas por metaloproteinases extracelulares, resultando no espalhamento destes domínios. Estes eventos de divisão resultaram na acumulação de produtos da quebra no citoplasma, dissolução de desmossomos, e rompimento da rede de filamentos intermediários de queratina e provável são importantes contribuintes para o desmantelamento da citoarquitetura que ocorre durante a morte celular programada (WEISKE et al. 2001). A quebra das caderinas desmossomais através de metaloproteinases também acontece em células de tumor e pode contribuir a perda de adesão e invasão no câncer (LORCH et al. 2004).

2.4.11 Outras modificações pos-transducionais que regulam a organização e destino de moléculas desmossômicas

Proteínas desmossômicas sofrem ambas fosforilação de serina-treonina e fosforilação da tirosina que regula o destino delas e suas interações com outras proteínas (Figura 4). Proteínas cinases, como PKC, podem fazer papéis positivos e negativos no processo de organização desmossômica (VAN HENGEL et al. 1997; AMAR et al. 1999; WALLIS et al. 2000), e atividade fosfatase de proteínas parece ser necessária para fases finais de formação da placa desmossômica (PASDAR et al. 1995a).

A proteína plakoglobina de “Armadillo” que é regulado tanto pela fosforilação serina/treonina e fosforilação de tirosina, tem sido o foco de muitos destes estudos. Plakoglobina é mais altamente fosforilada nas regiões das não-junções solúveis, elevando a possibilidade que seu destino durante a organização é regulada pela fosforilação (PASDAR et al. 1995b). Dissolução do desmossomo em

resposta ao tratamento com EGF de A431 resulta em uma translocação da plakoglobina dos limites células-células para o citoplasma. Fosforilação EGFR-dependente de Y693, Y742, e/ou Y729 foi mostrado que prejudica a associação de plakoglobina com desmoplakina, possivelmente afetando a junção de filamentos intermediários do citoesqueleto (Figura 4) (GAUDRY et al. 2001; MIRAVET et al. 2003). Plakoglobina também é um substrato para Src, Fer, e Fyn (MIRAVET et al. 2003) (Figura 4), e fosforilação a resíduos distintos direcionados por estas cinases tem diferentes efeitos nas interações proteína-proteína. Considerando que fosforilação Src de tirosina 643 aumenta plakoglobina ligada com desmoplakina, e diminuiu plakoglobina ligada a E-cadherin e α -catenin. Fyn e Fer primariamente fosforila tirosina 549, resultando em aumento da plakoglobina ligada a α -catenin e rompimento de sua interação com desmoplakina. Fosforilação da tirosina da plakoglobina não esta sempre associada com a perda de contato célula-célula e na realidade, tem sido associado com estabelecimento de adesão e diferenciação de Queratinocitos (CALAUTTI et al. 1998, 2002).

Como β -catenin, plakoglobina não-juncional está sujeita a degradação pela maquinaria proteossomica. Esta é eficazmente fosforilada em sua porção N-terminal por GSK-3 β na presença de Axin, e conseqüentemente associado com a ligase ubiquitinada β -TrCP; porém, a eficiência de degradação de plakoglobina é um pouco menor que aquela da β -catenin (KODAMA et al. 1999). Plakoglobina também é O-glicosilada na sua porção N-terminal perto da “ porção de destruição.” (“destruction box”). Acredita-se que esta modificação contrapõe a fosforilação por GSK-3 β e assim protege a plakoglobina da degradação de proteassomos (HATSELL et al. 2003). O seqüestro de plakoglobina pelo sistema membrana-citoesqueleto foi

proposto como um mecanismo que a torna inacessível para a maquinaria proteolítica (SADOT et al. 2000).

Desmoplakina pode ser fosforilada na serina 2849 a qual esta dentro de um local de consenso de proteína kinase A na extremidade C-terminal da molécula (Figura 4). Estudos iniciais realizaram em um contexto de uma desmoplakina N-terminal deletada que não é capaz de incorporar em junções mas ao invés, se alinha com filamentos intermediário citoplásmicos, sugerindo que fosforilação de Ser2849 seguida da ativação de PKA com forskolina inibe desmoplakina ligando aos filamentos intermediários do citoesqueleto (STAPPENBECK et al. 1994). Embora cartografia de fosfopeptídios confirmem que aquela desmoplakina endógena é fosforilada na Ser2849 em células forskolin-tratadas, ligação a filamentos intermediários em desmossomos maduros não pareciam estar comprometidos. Porém, resultados preliminares sugerem que a fosforilação reversível de desmoplakina pode regular sua distribuição na célula, libertando-a do citoesqueleto e mobilizar um grupo organização-competente quando a célula recebe sinais que induz formação de junção.

Anticorpos de pemphigus patogênicos também ativam fosforilação de componentes de desmossomos e alterações no cálcio intracelular e lipídio de vias de sinalização (OSADA et al. 1997; AOYAMA et al. 1999a e b). Ligação de anticorpos de “*Pemphigus vulgaris*” resulta em fosforilação e processamento de Dsg 3, e dissociação de plakoglobina. Além disso, plakoglobina parece ser necessária para a desacoplagem auto-anticorpos-dependente dos filamentos intermediários observada em um modelo “in vitro” para pemphigus (CALDELARI et al. 2001). Junto estas observações sugerem que eventos pos-transducionais de fosforilação são importantes

reguladores da organização de desmossomos e remodelagem em respostas a estímulos ambientais, incluindo esses que regulam eventos normais, como também situações patológicas como invasão tumoral e metástase e doenças autoimunes.

2.4.12 Proteínas Desmossômicas na Sinalização

Os membros da família de proteínas “Armadillo”, plakoglobina e PKPs tem múltiplas funções dentro e fora dos desmossomos. Plakoglobina é o mais próximo parente vertebrado de β -catenin, que é um famoso efetor para baixo no canônico caminho de sinalização da via Wnt. A sinalização Wnt inicia uma cascata de eventos que permite a β -catenin escapar a degradação da maquinaria proteassômica que normalmente assegura que seus níveis citoplásmicos permaneçam baixos. β -Catenin pode então translocar-se para o núcleo onde forma complexos com os fatores de transcrição LEF/TCF e ativa transcrição dos genes designados envolvida no modelo desenvolvimentista, decisões de destino celular, crescimento celular e sobrevivência (ZHURINSKY et al. 2000a).

A literatura que documenta a contribuição de plakoglobina para sinalização é complexa e levanta muitas perguntas sem resposta. Como β -catenin, super-expressão de plakoglobina induz anterior duplicação de eixo em ovos fertilizados de *Xenopus*, um fenótipo semelhante para os efeitos da super-expressão de Wnt (KARNOVSKY e KLYMKOWSKY 1995), e ligações a fatores transcricionais de LEF e TCF (KARNOVSKY e KLYMKOWSKY 1995; SIMCHA et al. 1998; ZHURINSKY et al. 2000b). Porém, antisense “knock down” de plakoglobina em *Xenopus* não interfere com estabelecimento de estruturas anteriores (KOFRON et al. 1997). Além disso, em *Drosophila*, plakoglobina resgata adesão, mas defeitos de sinalização que

são o resultado de rompimento da função de “Armadillos” (WHITE et al. 1998). Em ratos plakoglobina “Knock out”, letalidade embriônica é devido a defeitos cardíacos resultantes do comprometimento da organização desmossômica, em contraste com a letalidade embrionária, resultante da inabilidade para formar estruturas dorsais em ratos β -catenin “Knock out” (RUIZ et al. 1996; BIERKAMP et al. 1996; HUELSKEN et al. 2000). Baseado no fato que um forma membrana-ancorada de plakoglobina também induz duplicação de eixo (MERRIAM et al. 1997; KLYMKOWSKY et al. 1999) foi proposto que plakoglobina possa interferir com o sistema de degradação de β -catenina, enquanto resulta na elevação de β -catenina nuclear (MILLER e MOON 1997), ou isola os antagonistas da via de sinalização Wnt (KLYMKOWSKY et al. 1999).

Estudos com linhagens de células de mamíferos suportam a idéia que plakoglobina e β -catenina interagem diferentemente com a via de sinalização Wnt. Em uma avaliação comparativa de sinalização com β -catenina e plakoglobina, β -catenina estabilizada ativou localizador LEF/TCF cinco vezes mais potente que plakoglobina (WILLIAMS et al. 2000). Em células de MDCK, super-expressa de plakoglobina ou β -catenina eram ambos translocados ao núcleo, mas plakoglobina era ineficiente a recrutar LEF-1 para dentro das estruturas nucleares resultantes observadas nestas células (SIMCHA et al. 1998). Além disso, plakoglobina só ineficientemente forma complexos com LEF/DNA “in vitro”, e super-expressão de plakoglobina aumentaram a formação de complexos de β -catenin/LEF/DNA (ZHURINSKY et al. 2000a).

Por outro lado, outros dados sugere que no núcleo, plakoglobina na verdade interfere com a sinalização da β -catenina. Ambos Plakoglobina e β -catenin podem

ligar a TCF; porém, diferente da β -catenin, plakoglobina ligada a TCF pode tornar o complexo incapaz de ligar ao DNA, interferindo assim, com a transcrição nuclear. TCF-4 contém diferentes locais de ligação para plakoglobina e β -catenin e o complexo ternário foram identificados contendo todas as três proteínas. Quando fosforilado por CK2, a associação de TCF-4 com plakoglobina está reduzida enquanto sua associação com β -catenina não é afetada (MIRAVET et al. 2003). Assim, alterando a afinidade da plakoglobina com TCF-4 por fosforilação pode servir como um mecanismo importante para sinalização Wnt plakoglobina-regulada.

Plakoglobina pode não agir por si só, somente por vias dependentes de β -catenina. Consistente com esta ideia, plakoglobina retardou o crescimento de cabelo em ratos quando sua expressão foi dirigida por um queratina pele-específica promotor 14 (CHARPENTIER et al. 2000). Em contraste, β -catenin causou proliferação de folículo capilares e tumores que se assemelham a pilomatrixomas humano (GAT et al. 1998). Desde que a localização e níveis de expressão de β -catenin na pele de ratos super expressando plakoglobina não apareceram alterados (CHARPENTIER et al. 2000), alguns autores argumentam que é improvável que plakoglobina esteja regulando o crescimento de cabelo por atenuar a sinalização de β -catenina neste modelo.

Foi sugerido que plakoglobina pode estar sinalizando além de um específico subconjunto da via Wnt. Esta hipótese é apoiada pela observação de que ratos transgênicos que expressam Wnt-3 ou DVL-2 na pele exibiram um fenótipo semelhante a esses expressando plakoglobina, mas não β -catenina (MILLAR et al. 1999; CHARPENTIER et al. 2000), até mesmo embora ambas as proteínas sejam eficientes em elevar níveis de expressão de β -catenina em células de culturas (LEE et

al. 1999). Recentemente, também foi encontrado que em uma linhagem de células β -catenina-deficiente, plakoglobina exibe atividade transcricional quando co-expressa com TCF-4 ou LEF-1 (MAEDA et al. 2004). Então, plakoglobina é capaz de ativar a cascata de sinalização Wnt diretamente.

Plakoglobina foi implicado tanto como um supressor de tumor e como um oncogene. Plakoglobina, mas não o tipo selvagem de β -catenina, transformou linhagens RE3K de células epiteliais renais de rato. Este comportamento era dependente em sua habilidade para ativar a expressão do gene c-myc pelo sinalizador LEF/TCF (KOLLIGS et al. 2000). Não apenas isto sugere que plakoglobina desempenha um papel positivo em câncer, mas também indica que plakoglobina pode formar complexos transcricionais que reconhecem o DNA de distintas maneira para inibir ou induzir genes alvos plakoglobina-específicos. Por outro lado, perda de plakoglobina foi relatada em vários tipos de neoplasias, sugerindo uma função supressora de tumor (ABERLE et al. 1995; AMITAY et al. 2001).

Fatores que afetam o transporte de plakoglobina entre junções das células e o núcleo provêm outra camada provável de regulamento importante para suas funções sinalizadoras. Tratamento de queratinócitos com o inibidor de fosfatase, peroxovanadate, resultou em uma translocação rápida de plakoglobina e β -catenina da membrana para o núcleo. Translocação nuclear foi associada com aumento de plakoglobina ligada a TCF e diminuição regulatória da transcrição de gene pela construção localizadora TCF/LEF (HU et al. 2003). Coletivamente estes dados apóiam um papel para plakoglobina na regulação transcricional, ambos indiretamente por mecanismos β -catenin-dependentes, e diretamente pela transcrição de genes plakoglobina-específicos. Se plakoglobina positivamente ou negativamente

regula sinalização β -catenina-dependente pode depender da espécie, fase de desenvolvimento e outros fatores.

Como a plakoglobina, o PKPs ficam situados em desmossomos e no núcleo (SCHMIDT et al. 1997; KLYMKOWSKY 1999; BONNE et al. 1999). PKP2 foi achado no complexo RNA polimerase III holoenzima no núcleo. Embora o significado funcional desta associação não seja ainda conhecido, esta observação sugere que PKP2 possa desempenhar um papel mais fundamental na estrutura ou regulação da maquinaria transcricional. Fosforilação do resíduo de S38 de PKP2 no seu domínio N-terminal por uma kinase sérica C-TAK1 facilita a ligação com 14-3-3 que mantém PKP2 no citoplasma (MULLER et al. 2003), provendo um possível mecanismo para regular suas funções nucleares. Não foram mostrados que PKPs desempenha um papel direto na sinalização Wnt. Um possível papel indireto é indicado pelo fato de que PKP2 se liga a β -catenina por seu domínio inicial, e expressão de PKP2 em células SW480 super regula a sinalização β -catenin/TCF em um padrão dependente de β -catenina (CHEN et al. 2002). Se outro membro da família PKP têm funções semelhantes permanece uma pergunta sem resposta.

2.4.13 Considerações Finais

Apesar de extensamente estudados, estes biomarcadores ainda não foram utilizados na avaliação prognostica do carcinoma espinocelular do pênis.

O dogma atual na biologia do câncer é que a adesão celular é reduzida durante a transformação maligna, o que, permite que as células tumorais possam migrar, invadir e ter a capacidade de metastatizar. Muitas evidências atuais, apontam para a importância dos desmossomos e seus componentes no câncer. Da mesma

forma que a expressão da Involucrina que apresenta papel importante na diferenciação do epitélio escamoso.

Alterações na expressão de componentes desmosomais podem contribuir para a progressão da doença pela modificação de vias intracelulares de sinais de transdução e / ou por causar diminuição da adesão celular. Apesar disso, evidências definitivas que ligam desmosomos ao câncer ainda está faltando, entretanto uma quantidade substancial de evidências disponíveis, apóiam a idéia de que estão envolvidos na progressão das neoplasias. Várias mudanças na expressão dos componentes desmosomais foram documentados e mais estudos que comprovem estas mudanças de forma abrangente em elementos constituintes desmosomais durante tumorigenesis são necessários. Definir o papel de desmosomos como mediadores de transdução de sinais intracelulares e identificar alterações na sinalização que ocorrem em resposta a alterações nos padrões normais de expressão destes componentes será um importante passo futuro.

Embora a organização desmosômica esteja freqüentemente prejudicada nas células tumorais, há evidências conflitantes sobre que papel os desmosomos ou seus componentes desempenham na carcinogenesis. Alguns estudos demonstram aumento da expressão de componentes desmosomal em tumores invasivos enquanto outros demonstram maior desarranjo cromossomo em alguns tumores epiteliais avançados.

Diante disso estudar os componentes desmosômicos: Desmogleina; Desmoplakina e Plakoglobina, além da expressão da Involucrina em portadores de carcinoma epidermóide do pênis pode trazer uma importante contribuição para o entendimento desta neoplasia.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Frente a carência de marcadores de comportamento biológico em câncer de pênis, o presente estudo tem como objetivos:

- 1) Estudar a expressão imunoistoquímica da Involucrina no câncer de pênis.
- 2) Estudar a expressão imunoistoquímica dos componentes relacionados à atividade da placa desmossômica: desmogleina, desmoplakina e plakoglobina, no câncer de pênis.
- 3) Avaliar dados clínicos e variáveis demográficas e anatomopatológicas do tumor primário relacionados ao câncer de pênis.
- 4) Correlacionar variáveis clínicas, demográficas e anatomopatológicas com a expressão imunoistoquímica da Involucrina e dos componentes relacionados à atividade da placa desmossômica: desmogleina, desmoplakina e plakoglobina, na tentativa de identificar fatores de risco para sobrevida câncer específica, sobrevida global e metástase linfonodal.

POPULAÇÃO E MÉTODOS

4 POPULAÇÃO E MÉTODOS

Foram analisados retrospectivamente os prontuários dos pacientes submetidos à cirurgia para carcinoma epidermóide do pênis no Centro de Tratamento e Pesquisa – Hospital do Câncer no período de maio de 1953 a fevereiro de 1999. Foram selecionados os pacientes que realizaram a cirurgia do tumor primário com ou sem linfadenectomia inguino-iliaca. Nos pacientes que não fizeram linfadenectomia foram considerados apenas aqueles que tinham seguimento mínimo de cinco anos, tempo adequado para definir a ausência de metástase linfonodal.

A ficha de levantamento de dados (Anexo 1), foi preenchida com as informações obtidas dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME).

Foram estudados os respectivos materiais devidamente arquivados em parafina no Departamento de Anatomia Patológica e passíveis de confirmação diagnóstica. A partir do material existente nos blocos de parafina foram realizados blocos de TMA e posteriormente cortes para a realização de coloração imunoistoquímica para Involucrina e os componente relacionados à atividade da placa desmossômica: desmogleina, desmoplakina e plakoglobina.

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis, submetido a tratamento cirúrgico do tumor primário e a linfadenectomia regional, uni ou bilateral

em qualquer momento do seu seguimento, ou pacientes que tenham seguimento adequado por pelo menos 5 anos, dado já evidenciado na literatura como tempo adequado para assegurar não existir metástases.

Pacientes que tenham material arquivado suficiente para novos cortes histológicos e confirmação do diagnóstico.

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes que apresentavam segundo tumor primário.

Pacientes que tenham realizado tratamento adjuvante ou neo-adjuvante.

4.3 DIAGNÓSTICO

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

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

4.4 ESTADIAMENTO

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema TNM, UICC (GREENE et al. 2002) (Figura 6) onde se recomenda o agrupamento dos pacientes por estádios clínicos e se considera linfonodos regionais aqueles localizados nas regiões inguinais. As metástases pulmonares foram investigadas através de radiografias de tórax realizadas nas incidências pósterio-anterior e perfil.

TNM - Estadiamento TNM (UICC, 2002)	
ESTADIAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
Ta	Tumor verrucoso não invasivo
T1	Tumor invade tecido conectivo subepitelial
T2	Tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso
T3	Tumor invade uretra ou próstata
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
ESTADIAMENTO DOS LINFONODOS REGIONAIS	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases única em linfonodo inguinal superficial
N2	Metástases múltiplas ou bilaterais em linfonodos inguinais superficiais
N3	Metástases em linfonodos inguinais profundos ou ilíacos
ESTADIAMENTO DAS METÁSTASES A DISTÂNCIA	
Mx	Metástases a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância

Figura 6 - Estadiamento TNM UICC, (2002).

4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

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

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

4.6 SEGUIMENTO DOS PACIENTES

O acompanhamento dos pacientes se deu em consultas ambulatoriais. As consultas foram realizadas mensalmente no primeiro semestre, e bimestrais no segundo. Do segundo ao terceiro anos de seguimento estas consultas passaram a ser trimestrais, sendo após o terceiro ano realizadas anualmente.

Em todas as consultas eram realizados exame físico sistemático locorregional.

As Radiografias de tórax eram realizadas anualmente ou na vigência de sintomas.

Os pacientes foram classificados segundo o seguimento em:

- a) vivos sem câncer,
- b) mortos pelo câncer ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até 30 dias pós-cirurgia),
- c) mortos por outras causas,
- d) perdidos no seguimento.

4.7 EXAME ANATOMOPATOLÓGICOS DO TUMOR PRIMÁRIO

Todas as lâminas foram revistas por dois patologista, Prof^o. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo e Prof. Dr Antonio Cubilla,

Os critérios usados para definir as variáveis anatomopatológicos foram:

- a) Espessura do tumor:

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

- b) Grau de diferenciação histológica:

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

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

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

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

c) Embolização vascular linfática:

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

d) Embolização vascular venosa:

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

E estas forma agrupados em um único grupo

e) Infiltração de corpo esponjoso ou cavernoso:

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

f) Infiltração da Uretra:

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

g) Tipo de invasão:

Padrão estabelecido segundo critérios modificados de ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989). Conforme previamente descrito por GUIMARÃES et al. (2006).

Padrão de infiltração tipo Regular (Deslocamento):

Caracterizado quando as células tumorais invadem em grandes blocos celulares com interface tumor-hospedeiro bem delimitada.

Padrão de infiltração tipo Irregular (Infiltrante):

Caracterizado por invasão em blocos de cordões sólidos de células tumorais que infiltram amplamente o estroma do órgão.

h) Tipo Histológico (morfologia):

Foi utilizado os critérios previamente descritos e divididos nos grupos de risco conforme previamente publicado por GUIMARÃES et al. (2009) e agrupados em baixo risco (Warty, warty invasivo, papilar, condiloma gigante, pseudoglandular, cuniculatum, verrucoso, verrucoso invasivo, pseudohiperplásico, e as formas mistas destas variantes) e alto risco (demais morfologias).

4.8 TÉCNICA DE TMA

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, foram identificadas as lâminas histológicas referentes à peça cirúrgica (tumor peniano). Em virtude de haver, em vários casos, mais de uma lâmina representativa do tumor primário, todas elas foram revistas por três patologistas (Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do

Câncer A C Camargo e Dra. Isabela Werneck da Cunha e o Prof. Dr. Antonio Cubilla), selecionando-se aquela mais representativa da lesão.

Para construção do TMA (Anexo 2) o médico patologista selecionou nas lâminas de hematoxilina-eosina as áreas do tumor a serem amostradas nos blocos de parafina por um equipamento computadorizado de precisão. Foram obtidos cilindros de 1 mm da área tumoral que serão montados em um novo bloco de parafina com posição bidimensional determinada e gravada pelo equipamento. Foram realizadas amostras em duplicata de cada caso, o que necessitou de dois blocos receptores. A partir deste novo bloco (BP-TMA) foram preparados cortes histológicos em lâminas previamente tratadas com película aderente, nas quais foram executadas as reações de imunohistoquímica com anticorpos a serem pesquisados, pelas técnicas habituais.

Um caso foi definido como adequado, quando o corte resultante ocupou pelo menos 24% da área total do cilindro. Foram realizados cortes sequenciais de quatro micrômetros de espessura, colhidos em lâminas adesivas oriundas da Instrumedics (Hackensack NJ, EUA).

Para maximizar o uso do TMA, todos os cortes de cinco milímetros foram colhidos em uma única sessão e armazenados para uso posterior. Para tal utilizaram-se lâminas adesivas da Instrumedics Inc (USA). Tal lâmina contém um adesivo próprio e os cortes são colhidos em fita adesiva com a transferência posterior para a lâmina. Esta técnica permite que nenhum corte seja perdido e tenhamos o exato controle da profundidade do cilindro de tecido. Realizou-se o controle do número de casos avaliáveis pela coloração de uma lâmina a cada 25 cortes pela contagem dos cilindros, quando presentes. O TMA foi considerado esgotado quando acima de 25% das amostras não se encontravam presentes nas lâminas.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópios comuns e os resultados classificados para cada reagente. Os resultados foram correlacionados às variáveis estudadas.

4.9 PROTOCOLO DE REAÇÕES - TMA

O bloco de TMA foi cortado no micrótomo rotativo na espessura de 5 μm . Colocou-se o tape contra o bloco de TMA e o cortou. O tape com o material foi colado na lâmina apropriada. A lâmina com o tape sofreu a irradiação com UV por 30 minutos, sendo em seguida mergulhada em solução solvente (TPC) e seca a temperatura ambiente. Os tapes foram retirados após a secagem. As lâminas sofreram banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em freezer.

Realizou-se o controle do número de casos avaliáveis pela coloração de uma lâmina a cada 25 cortes pela contagem dos cilindros, quando presentes. O TMA foi considerado esgotado quando acima de 25% das amostras não se encontravam presentes nas lâminas.

4.9.1 Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica para cada anticorpo foram realizadas em duas lâminas do TMA. Como dito anteriormente, há dois cilindros de cada tumor alocados no bloco de TMA, o que fez que as análises fossem feitas em quadruplicata.

Os cortes histológicos foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com irradiação em banho-maria, utilizando-se tampão EDTA + Tris, pH 9,0 por 40

minutos, deixando-se mais 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com três trocas de 5 minutos cada. Após o bloqueio da peroxidase, também se fez o bloqueio de proteína (DAKO® Protein Block Serum-Free) por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, conforme a Tabela 1, por 2 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada, sendo incubadas, posteriormente, com NovoLink Max Polymer (Novocastra), por 30 minutos, à temperatura ambiente, passando em seguida por três lavagens de 5 minutos em PBS. As lâminas foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, DAKO®) e contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck®). As reações foram realizadas em duas lâminas de TMA com intervalo de 60 cortes entre elas, garantindo que as células analisadas não fossem as mesmas. Procedeu-se então a montagem das lâminas em Entellan (MERCK, Germany).

Para todos os anticorpos testados foram realizados lâminas controle da reação. Como controle positivo foi utilizado um tecido sabidamente com expressão da proteína a ser pesquisada. Foram realizadas duas lâminas de controle negativo. A primeira delas foi feita com a retirada do anticorpo primário e substituição por soro bovino fetal. O segundo controle negativo foi realizado com a retirada da reação do anticorpo secundário e substituição por soro contendo imunoglobulina do mesmo halotipo do anticorpo primário, mas da mesma espécie.

Tabela 1 - Descrição do anticorpo primário utilizado, clones, título de diluição e fabricantes.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Involucrin Ab-1	SY5	1:300	LAB Vision, Dr. Fremont CA/EUA, cat # MS-126
Desmoglein	DG 3.10	1:25	Chemicon International, EUA, cat # CBL 174
Plakoglobin	-	1:300	Neo Markers, Dr. Fremont CA/EUA, cat # RB 9236
Desmoplakin 1&2	DP 1 &2	Kit comercial pre-diluido	Cat # RDI – PRO 65145

4.10 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

Por se tratar de um estudo retrospectivo, foi optado por avaliar a qualidade da imunorreatividade dos casos estudados. Para tal, foram utilizados marcadores específicos, como citoceratina AE1/AE3 (DAKO®) e Vimentina (DAKO®). O resultado foi uma imunorreatividade baixa em apenas dois casos (0,6%), que foram excluídos. Foram também excluídos da análise casos que não tinham material do tumor avaliável no cilindro de TMA. Um corte de tecido foi considerado não informativo quando havia menos do que 25% de área tumoral representada. A análise da expressão imunoistoquímica das proteínas Involucrina, Desmogleina, Plakoglobina e Desmoplakina foi realizada, quantitativamente, por meio do Sistema Automatizado de Imagem Celular (ACIS III DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Especificações do aparelho e encontram-se no **Anexo 3**.

De uma maneira resumida, os componentes do ACIS III consistem de um microscópio digital automatizado (escaneador de lâminas), um computador com janela de captura de imagens e um sistema de processamento de imagens. Cada lâmina corada por imunoistoquímica é digitalizada e suas imagens capturadas são revisadas pelo patologista na tela do computador. Um mínimo de seis campos de

maior poder de aumento é selecionado pelo patologista. O ACIS III é capaz de detectar, contar e classificar células baseadas na cor, tamanho e formato. Este sistema reconhece 256 níveis de intensidade de coloração imunoistoquímica que são convertidos para um escore fracionado da área selecionada. Uma média de escore de todas as áreas também é calculada. Detalhes sobre o “*hardware*” e “*software*” do ACIS III são avaliáveis nos trabalhos de BAUER et al. (2000), WANG et al. (2001) e SUN et al. (2002).

Para análise da expressão das proteínas foi utilizado o programa computacional. Este programa faz análise da densidade óptica do componente citoplasmático ou nuclear conforme a necessidade e marcadores específicos.

Foram quantificadas as intensidades das densidades ópticas dos diferentes anticorpos, além da medida da área tumoral marcada, identificadas como área marrom (dark brown e light brown area) e área azul (blue area). Foi então calculada uma relação entre a área marrom e a área total (marrom + azul) que foi utilizada para análise.

Devido a multiplicidades de metodologias utilizadas nos estudos relatados e escassez de trabalhos em tumores de pênis utilizando estes marcadores, bem como da porcentagem de células positivas mesmos em outros tumores, foi realizado avaliação de diversas porcentagens de positividade e escolhidas aquelas porcentagens com resultados significativos.

Para a Involucrina foi utilizada positividade de 25% de células positivas; para a desmoplakina foi utilizada 10% e para a plakoglobina e desmogleinas foi utilizada positividade de 50%, (Figuras 7 a 14).

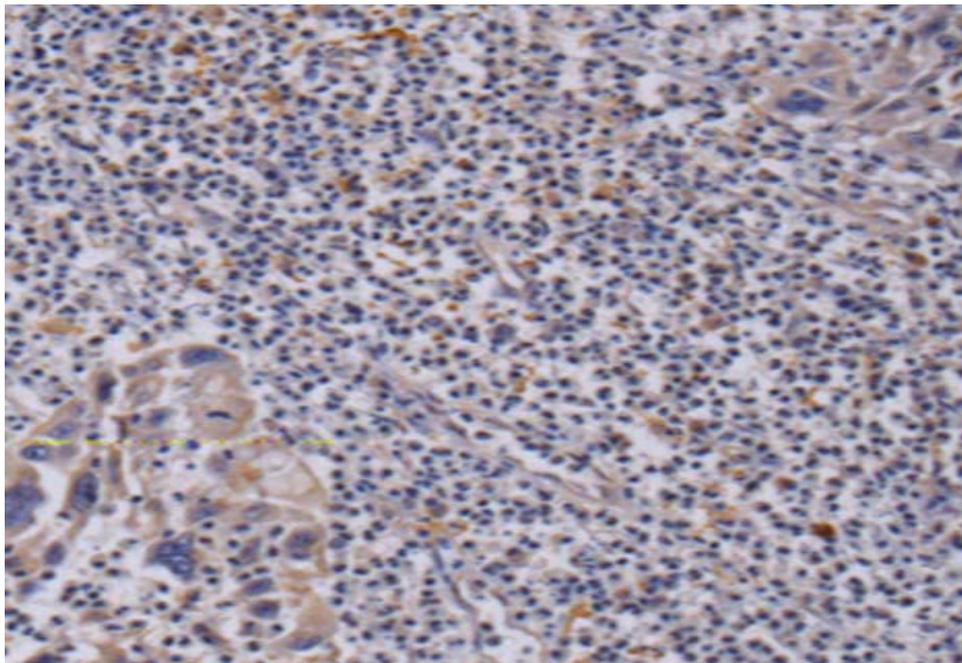


Figura 7 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<25%) para a Involucrina. (aumento 100x)

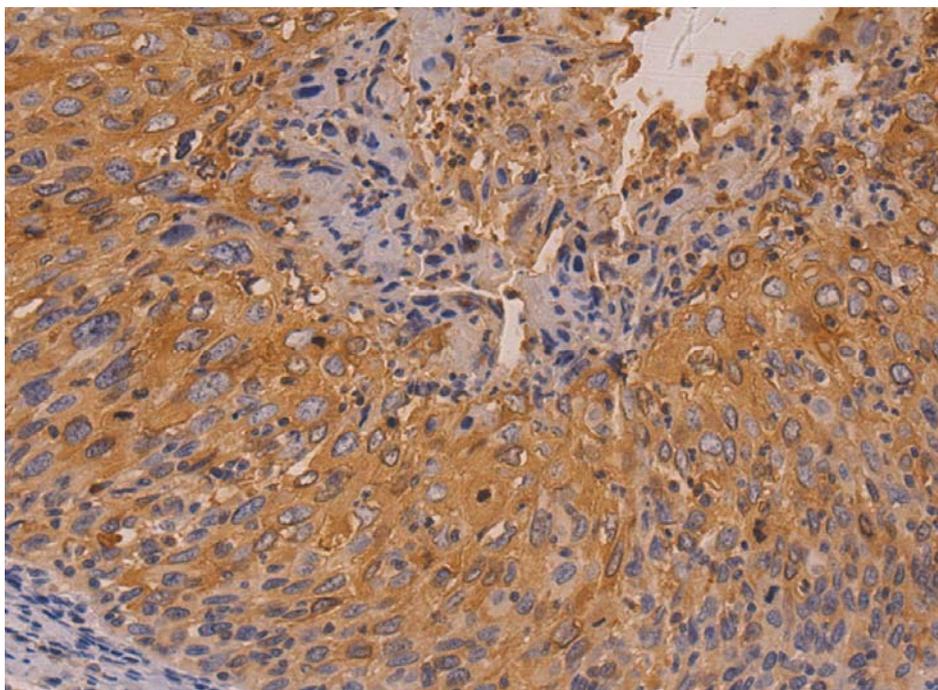


Figura 8 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>25%) para a Involucrina. (aumento 200x).

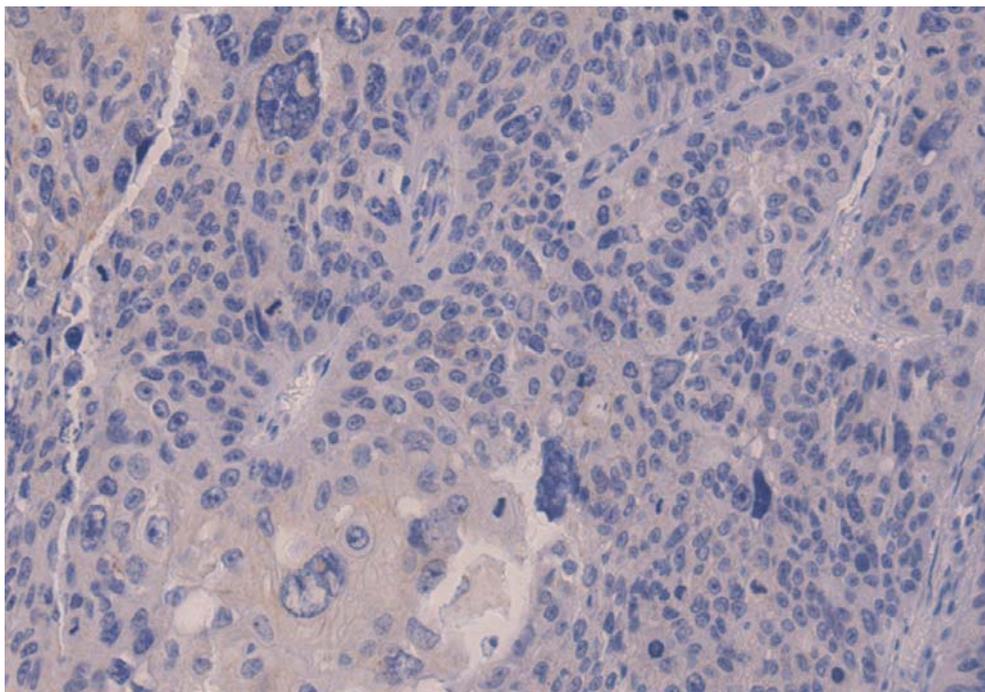


Figura 9 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<10%) para a Desmoplakina. (aumento 200x)

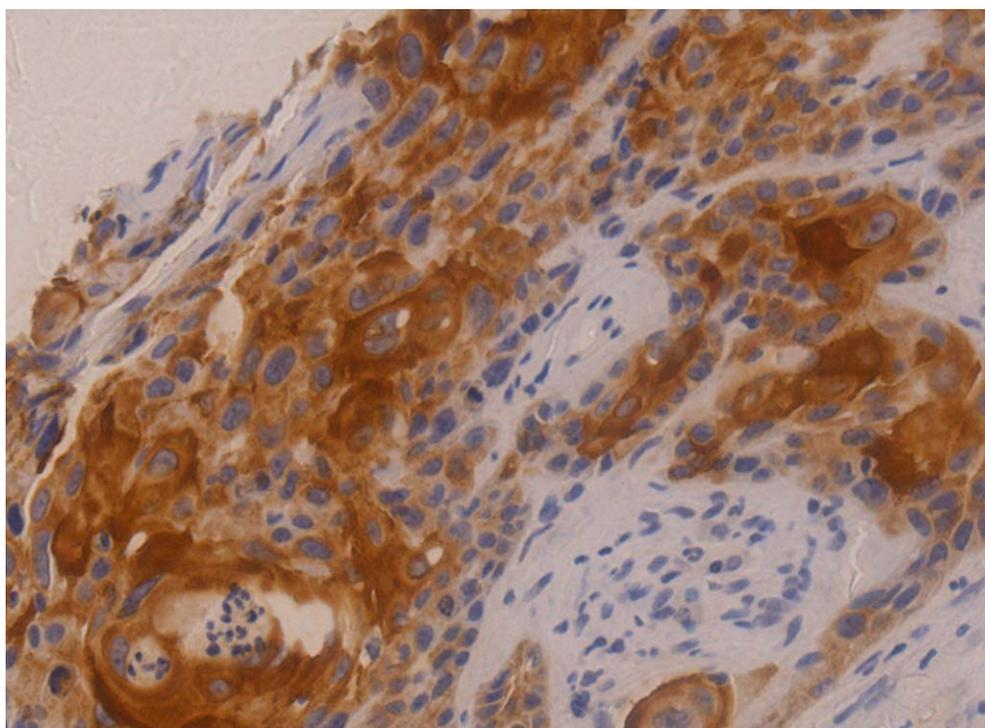


Figura 10 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>10%) para a Desmoplakina. (aumento 200x).

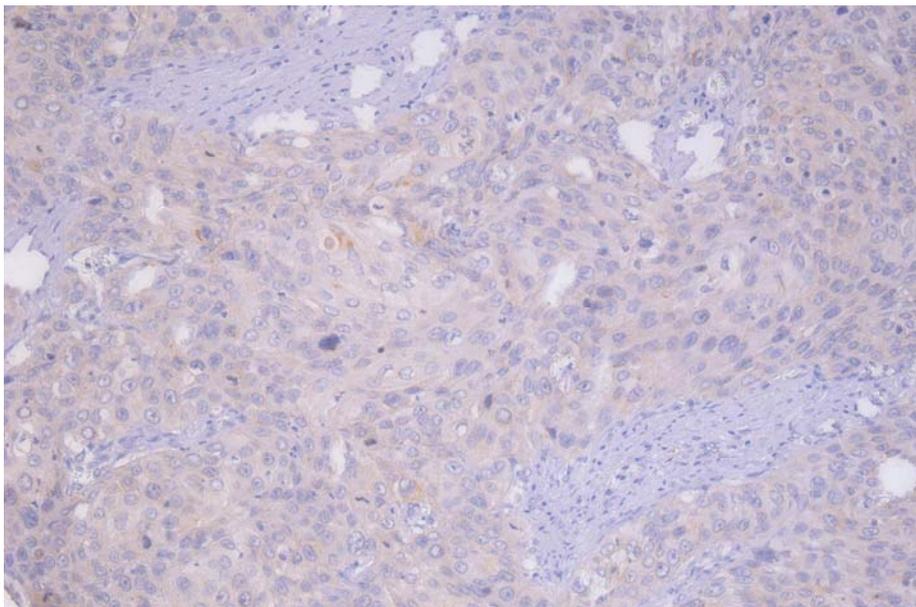


Figura 11 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<50%) para a Plakoglobina. (aumento 200x)

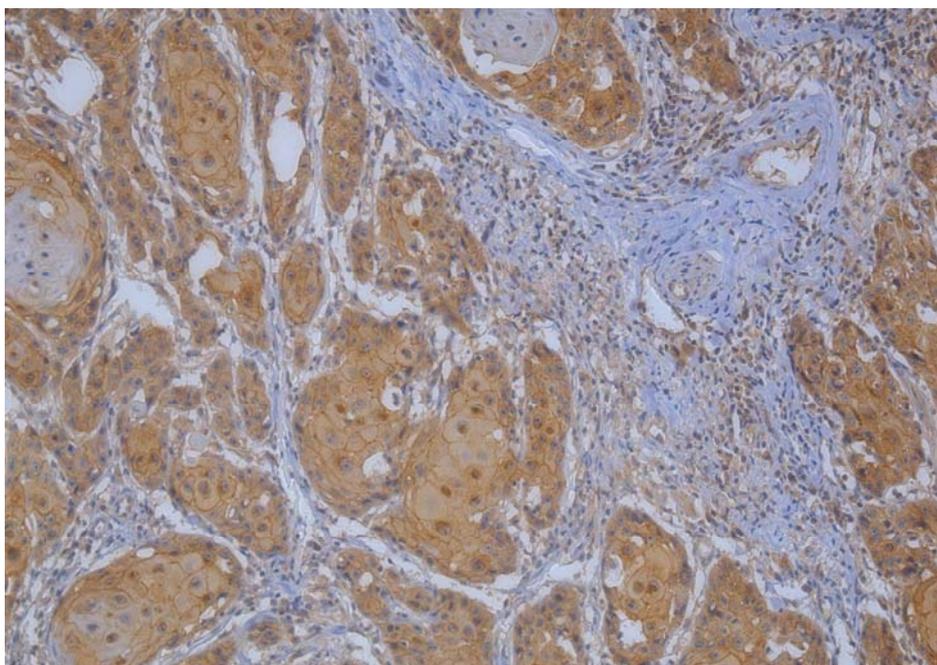


Figura 12 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>50%) para a Plakoglobina. (aumento 200x)

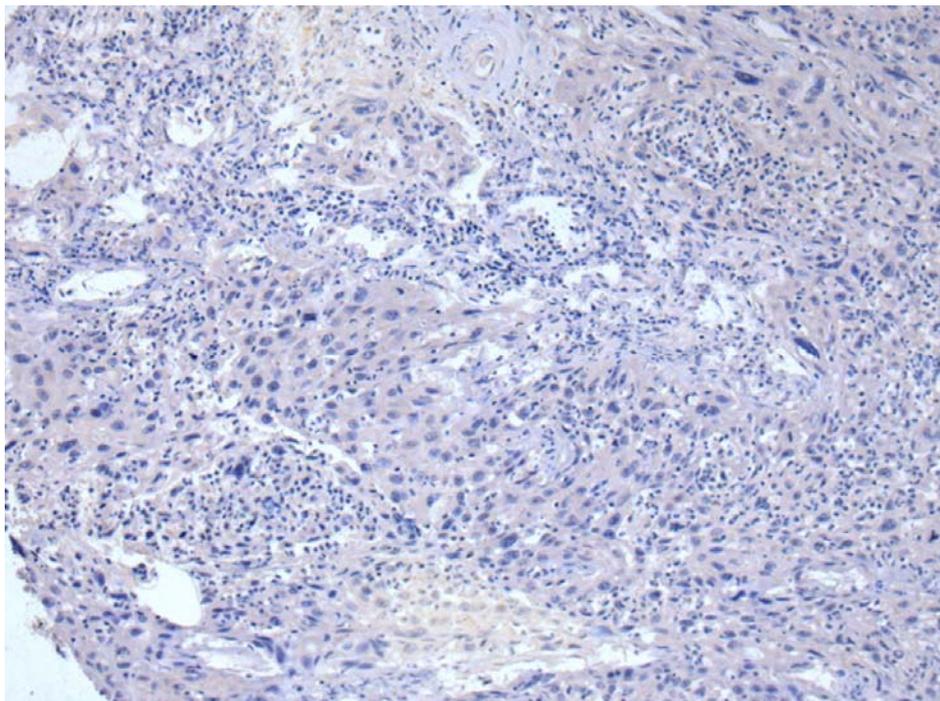


Figura 13 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa (<50%) para a Desmogleina. (aumento 100x)

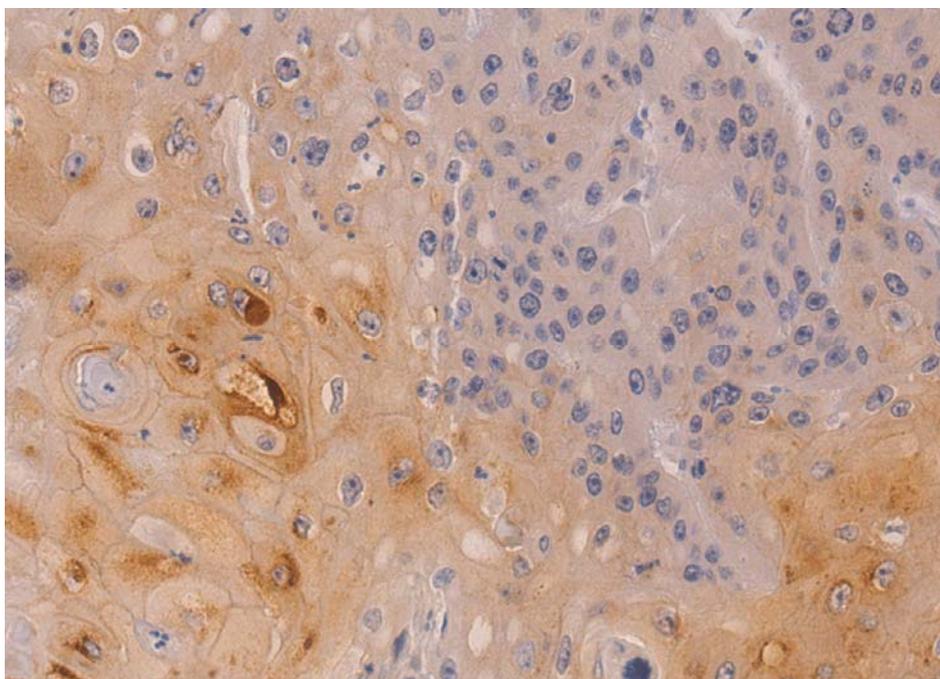


Figura 14 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (>50%) para a Desmogleina. (aumento 200x)

4.11 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

4.11.1 Aspectos demográficos e clínicos

A Tabela 2 apresenta as características clínico-demográficas da população estudada.

A idade dos 288 pacientes variou de 24 a 87 anos com média de 54 anos e mediana de 53 (dp=13,4). Cento e noventa e quatro pacientes (67,4%) apresentavam idade inferior a 60 anos e 94 (32,6%) tinham mais de 60 anos.

Duzentos e vinte e três pacientes (77,4%) eram brancos e 65 (22,6%) não brancos.

Dos 288 pacientes, 210 (72,6%) eram casados e 39 (13,5%) não casados (solteiros, separados, viúvos) e em 39 (13,5%) não havia informação. Antecedentes de doença venérea foi referida em 84 pacientes (29,2%); Noventa e cinco (33,0%) negavam antecedentes venéreos e não havia informação em 109 (37,8%) dos casos.

Apenas 44 pacientes (15,27%) foram submetidos a postectomia, em 31 (10,8%) a postectomia foi realizada em decorrência do tumor primário e em 13 casos (4,5%) esta foi realizada sem relação ao tumor primário. Duzentos e vinte e sete pacientes (78,8%) não a realizaram. Em 17 (5,9%) não havia a informação.

Na apresentação à primeira consulta, 204 pacientes (70,8%) apresentavam o tumor do pênis intacto, enquanto 77 (26,7%) já tinham sido biopsiados previamente. Sete pacientes (2,4%) foram referidos após a amputação.

A principal queixa referida pelos pacientes foi a ferida em 265 casos (92,01%) e estava associado a dor, inflamação local, e prurido na maioria dos casos. Em 140 (48,6%) a ferida foi a única queixa.

O tempo de evolução da doença até o diagnóstico, variou de 1 a 240 meses com média de 18 (dp=29,1) e mediana de 8 meses. E foram agrupados para análise em até 6 meses e mais que 6 meses de evolução.

Tabela 2 - Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Número de Pacientes	%
Idade	Até 60 anos	67,4
	>60 anos	32,6
Estado Civil	Casados	72,9
	Não casados	13,5
	Sem informação	13,5
Raça	Branca	77,4
	Não Branca	22,6
Tempo de Evol. da doença	Até 6 meses	42,7
	>6 meses	55,2
	Ign	2,1
Antecedentes venérios	Não	33,0
	Sim	29,2
	Sem informação	37,8
Estadiamento cT*	T1	6,9
	T2	49,0
	T3	38,9
	T4	5,2
Estadiamento cN*	N0	46,2
	N1	16,0
	N2	32,3
	N3	3,5
	Sem informação	1,7
Situação à primeira consulta	Biópsiado	26,7
	Intacto	70,8
	Amputado	2,4

*Estadiamento TNM (UICC 2002).

De acordo com o estadiamento clínico TNM (2002), 20 (6,9%) apresentavam tumores T1, 141 (49,0%) tumores T2, 112 (38,9%) T3 e 15 (5,2%) T4. Em relação ao estágio N0, N1, N2, N3 e Nx foi respectivamente, 134 (46,2%); 46 (16,0%); 93 (32,3 %); 10 (3,5%) e 5 (1,7%) (Tabela 3 e Figuras 7 e 8).

Tabela 3 - Número e porcentagem de pacientes segundo estadiamento clínico T e N dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Estadio Clínico T	Estádio Clínico N					Total n(%)
	N0 n(%)	N1 n(%)	N2 n(%)	N3 n(%)	Sem informação n(%)	
T1	18(6,2)	1(0,3)	1(0,3%)			20(3,2)
T2	76(26,4)	19(6,6)	43(14,6)	1(0,3)	2(0,7)	141(29,6)
T3	35(12,2)	24(8,3)	42(14,6)	8(2,8)	3(1,0)	112(60,0)
T4	5(1,7)	2(0,7)	7 (2,4)	1(0,3)		15(5,6)
Total	134(46,4)	46(16,0)	93(32,0)	10(3,5)	5(1,7)	288(100,0)

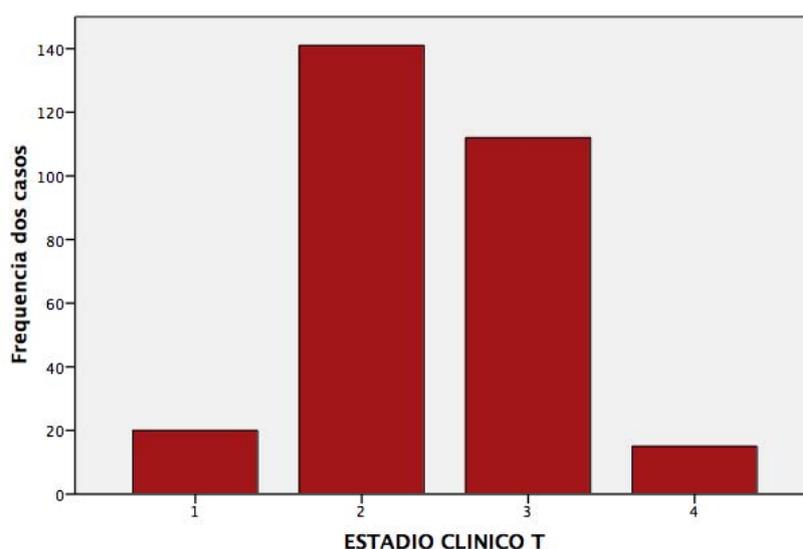


Figura 15 - Caracterização do estadiamento clínico T dos 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.

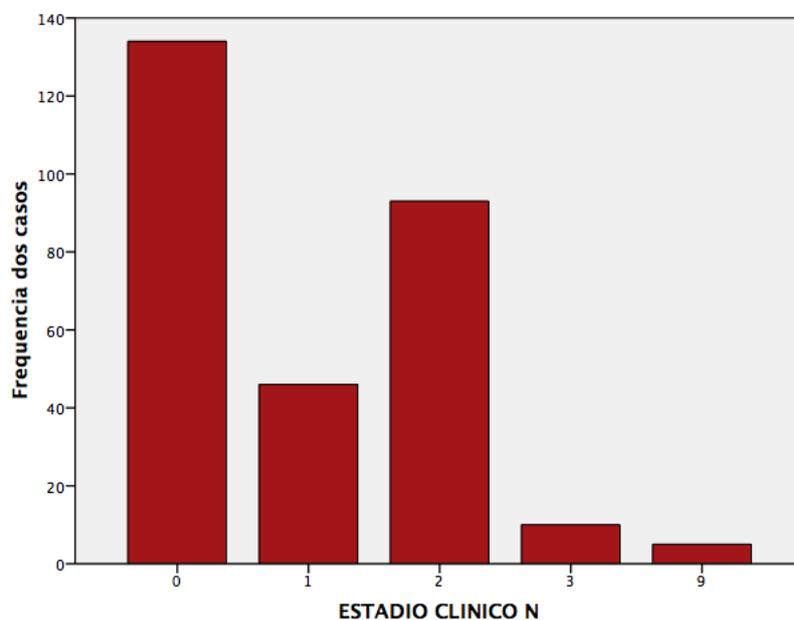


Figura 16 - Caracterização do estadiamento clínico N dos 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.

A Tabela 4, apresenta as características anatomopatológicas do tumor primário nos 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.

Tabela 4 - Frequência de variáveis anatomopatológicas do tumor primário dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Número de Pacientes	%
Grau de diferenciação		
I	79	27,4
II	92	31,9
III	117	40,6
Espessura do tumor		
Até 5 mm	74	25,7
>5 mm	210	72,9
indeterminada	4	1,4
Permeação vascular-linfática		
Ausente	196	68,1
Presente	75	26,0
Indeterminada	17	5,9
Infiltração Peri-neural		
Ausente	181	62,8
Presente	90	31,2
Indeterminada	17	5,9
Infiltração corpo esponjoso		
Ausente	22	7,6
Presente	213	74,0
Indeterminada	53	18,4
Infiltração de corpos cavernosos		
Ausente	75	26,0
Presente	145	50,3
Indeterminada	68	23,6
Infiltração de uretra		
Ausente	113	39,2
Presente	81	28,1
Indeterminada	94	32,6
Coilocitose		
Ausente	56	19,4
Presente	72	25,0
Indeterminada	159	55,2
Invasão Órgãos Adjacentes		
Ausente	267	92,7
Presente	4	1,4
Indeterminada	17	5,9
Tipo Histológico		
Baixo risco	63	21,9
Alto risco	225	78,1

4.11.2 Aspectos cirúrgicos

Cento e sessenta e dois (56,2%) pacientes foram submetidos a amputação parcial do pênis e 108 (37,5%) à amputação total. Em 1 caso foi realizada excisão ampla do tumor (ressecção local com margem) (0,3%). Amputação inter-ilíaco abdominal foi realizada em 4 casos (1,4%) e Emasculação em 13 casos (4,5%).

Em 48 (16,7%) pacientes foi realizado esvaziamento ínguino-crural e em 94 (32,6%) esvaziamento ínguino-iliaco. Em 146 (50,7%) não se realizou esvaziamento inguinal, mas esse grupo de pacientes apresenta seguimento maior que 5 anos. (Tabela 5)

Tabela 5 - Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 288 pacientes portadores de câncer de pênis.

Tipo do Esvaziamento	n	%
Linfadenectomia ínguino-crural	48	16,7
Linfadenectomia ínguino-iliaco	94	32,6
Sem linfadenectomia	146	50,7
Total	288	100

No total foram dissecados 4197 linfonodos nos 142 pacientes submetidos a linfadenectomia com média de 29,56 por paciente (dp= 16,31), variando de 3 a 87 linfonodos. Em 68 dos 142 pacientes (47,9%) não foram encontradas metástases linfonodais à linfadenectomia. Em 74 dos 142 (52,11%) os linfonodos apresentavam acometimento neoplásico. Houve um total de 299 linfonodos metastáticos, com variação de 1 a 25 por paciente com média de 4,04 (dp= 4,87). (Tabela 6)

De uma forma geral, 214 (74,3%) pacientes foram classificados como

negativos para metástases linfonodais (clínica e patologicamente) enquanto 74 (25,7%) pacientes foram classificados como positivos.

Tabela 6 - Número e percentagem de linfonodos, segundo tipo de esvaziamento linfonodal.

Tipo do Esvaziamento	linfonodos dissecados	linfonodos metastáticos
	n %	n %
Inguinal	945 (22,51)	83 (27,75)
Inguino-iliaco	3252 (77,48)	216 (72,24)
Total	4197 (100)	299 (100)

Considerando os 72 pacientes em que havia informação sobre a lateralidade dos linfonodos metastáticos, observou-se que 37 (51,38%) apresentavam metástases unilaterais e 35 (48,61%) bilaterais.

Sessenta e cinco pacientes apresentavam informações sobre a topografia dos linfonodos metastáticos, sendo 52 inguinais e 13 inguino-iliaco, além deste em 9 casos com linfonodos positivos, não havia informação sobre a topografia. Em 68 casos os linfonodos dissecados eram negativos para neoplasia e em 146 (50,7%) não foi realizada linfadenectomia. (Tabela 7)

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes segundo a topografia dos linfonodos metastáticos.

Nível	Número de pacientes (%)
Inguinal	52 (18,1)
Inguino-ilíaco	13 (4,5)
Ign	9 (3,1)
Não realizaram linfadenectomia	146 (50,6)
Linfonodos negativos	68 (23,6)
Total	288 (100)

Dos 142 pacientes submetidos a linfadenectomias, 37 foram realizados com intenção profilática, ou esvaziamento de princípio (26,1%), quando o tumor apresentava características clínicas e anatomopatológicas desfavoráveis; e de forma terapêutica, esvaziamento de necessidade em 105 casos (73,9%), quando as linfonodomegalias persistiam clinicamente positivas após curso de antibioticoterapia.

O tempo de seguimento variou de 0,1 a 452,8 meses com média de 109,35 (dp=97,97) e mediana de 87,0 meses.

Em 70 pacientes (24,3%) houve recorrência tumoral. Em 50 casos (71,42%) foi locoregional, em 13 (18,57%) foi à distância e em 7 (10%) foi somente a distância.

Ao final do seguimento, 111 (38,5%) pacientes estavam vivos sem doença, 20 (6,9%) vivos com câncer, 47 (16,3%) morreram em decorrência do câncer ou de complicação do tratamento. A mortalidade até 30 dias da cirurgia foi de 5,6% (7 pacientes), 97 (33,7%) faleceram por outras causas e 13 (4,5%) foram perdidos de seguimento (Tabela 8). Dentre os 13 pacientes perdidos de seguimento, 7 casos

(53,84%) ocorreram após 1 anos de seguimento. Todos estavam livres de doença ao momento da última informação.

Tabela 8 - Situação clínica dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.

Situação Clínica	N	%
Vivos sem doença	111	38,5
Vivos com doença	20	6,9
Óbito por câncer / complicação do tratamento (inclui óbito até 30 dias da cirurgia)	47	16,3
Óbito por outra causa	97	33,7
Perdidos de seguimento	13	4,5

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram registradas em uma ficha de levantamento padronizada (Anexo 1) e digitadas e arquivados em um banco de dados. Para a análise estatística será utilizado o *software for Windows Statistical Package for Social Science (SPSS)*, versão 16.0.

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

A mensuração das variáveis quantitativas foram expressas pelas médias e respectivos desvios padrões. As associações das variáveis qualitativas com expressão da Involocrina, desmogleina, desmoplakina e plakoglobina e presença de metástase linfonodal foram efetuadas com o teste do qui-quadrado bi-caudal; sempre que necessário, devido às frequências esperadas inferiores ao valor 5 dentro de uma tabela maior que 2x2, utilizando-se o valor do qui-quadrado bi-caudal corrigido. (Teste de Fisher).

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

As sobrevidas global e câncer específica foram realizadas pelo estimador produto de limite de KAPLAN e MEIER (1958) e a comparação entre curvas através do teste de Log-rank. Na análise multivariada para sobrevida será utilizado o modelo

de riscos proporcionais de COX (1972) calculando-se as razões de risco proporcional para óbito.

As variáveis que atingirem significância estatística na análise univariada para sobrevida câncer específica e sobrevida global, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingirem valores de p de até 0,20.

O tempo de sobrevida global foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data da última informação objetiva observada (para os pacientes vivos nesta data) ou a data do óbito decorrente de qualquer motivo. Os pacientes vivos na data da última informação foram considerados sob censura para a curva de sobrevida pelo método de KAPLAN e MEIER (1958) ou para utilização da regressão de COX (1972).

Pacientes que não compareceram as consultas ou sem informações por um período superior a duas vezes o estipulado para retorno foram considerados perdidos de seguimento na data da última informação. Esses pacientes contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

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

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas com eliminação de casas decimais. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0.05$.

***ANÁLISE DE RISCO E
ASPECTOS ÉTICOS***

6 ANÁLISE DE RISCO E ASPECTOS ÉTICOS

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

Desta forma, não foi necessária a adoção de consentimento pós-informado. Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo.

O uso do material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes pois a terapêutica julgada necessária para os mesmos já havia sido instituída e nenhum material foi extinguido.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital AC Camargo e foi aprovado em 28/11/2006. Está protocolado sob o número 871/06.

RESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

7.1.1 Imunoistoquímica da Involucrina

A imunorreatividade da Involucrina (considerando 25% de área positiva) foi positiva em 226 (79,9%) e negativa em 51 (20,1%). Não houve associação entre os índices de imunorreatividade da Involucrina com as variáveis clínico-demográficas (idade, raça, tempo de evolução, antecedentes venéreos, postectomia, estágio clínico T e estágio clínico N) (Tabela 9).

Tabela 9 - Imunorreatividade da Involucrina segundo as variáveis clínico-demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Involucrina(-)* N (%)	Involucrina (+)* N (%)	p(x ²)
Idade	Até 60 anos	41(21,5)	150(78,5)	0,423
	Mais que 60 anos	16(17,4)	76(82,6)	
Raça	Branca	47(21,6)	171(78,4)	0,276
	Não Branca	10(15,4)	55(84,6)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	21(17,1)	102(82,9)	0,244
	Mais que 6 meses	35(22,7)	119(77,3)	
Antecedentes venéreos	Não	16(17,0)	78(83,0)	0,125
	Sim	22(26,5)	61(73,5)	
Postectomia	Não	43(19,4)	179(80,6)	0,855
	Sim	8(18,2)	36(81,8)	
Estadiamento cT	T1-T2	32(20,1)	127(79,9)	0,994
	T3-T4	25(20,2)	99(79,8)	
Estadiamento cN	N negativo	23(17,3)	110(82,7)	0,204
	N positivo	34(23,4)	111(76,6)	

*Excluídos os casos sem informação.

Dentre as variáveis anatomopatológicas avaliadas o Grau de diferenciação tumoral ($p < 0,001$); a presença de infiltração peri-neural ($p=0,002$) e infiltração de corpos cavernosos ($p=0,021$) e a presença de coilocitose ($p=0,006$) e o tipo Histológico ($p=0,043$) se correlacionaram com a expressão da Involucrina. Não houve associação entre as demais variáveis anatomopatológicas e a expressão imunohistoquímica da Involucrina. (Tabela 10)

Tabela 10 - Imunorreatividade da Involucrina segundo variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Involucrina (-)* N (%)	Involucrina (+)* N (%)	P(x ²)
Diferenciação	Grau I	5(6,4)	73(93,6)	<0,001
	Grau II-III	52(25,4)	153(74,6)	
Espessura tumoral	Até 5mm	10(13,7)	63(86,3)	0,114
	>5mm	46(22,3)	160(77,7)	
Permeação vascular-linfática	Não	34(17,5)	160(82,5)	0,172
	Sim	18(25,0)	54(75,0)	
Infiltração peri-neural	Não	26(14,6)	152(85,4)	0,002
	Sim	27(30,7)	61(69,3)	
Infiltração de corpo cavernoso	Não	8(10,8)	66(89,2)	0,021
	Sim	34(23,9)	108(76,1)	
Infiltração de corpo Esponjoso	Não	2(9,1)	20(90,9)	0,264
	Sim	43(20,5)	167(79,5)	
Infiltração de uretra	Não	20(17,9)	92(82,1)	0,426
	Sim	18(22,5)	62(77,5)	
Coilocitose	Ausente	19(35,2)	35(64,8)	0,006
	Presente	10(14,1)	61(85,9)	
Tipo de Invasão	Regular	12(16,9)	59(83,1)	0,559
	Irregular	38(20,1)	151(79,9)	
Tipo Histológico	Baixo risco	7(11,1)	56(88,9)	0,043
	Alto risco	50(22,7)	170(77,3)	

*Excluídos os casos sem informação.

7.1.2 Imunoistoquímica da Desmoplakina

A imunorreatividade da Desmoplakina (considerando 10% de área positiva) foi positiva em 46 (17,2%) e negativa em 221 (82,8%). Houve correlação entre a imunorreatividade da Desmoplakina com Antecedentes Venéreos ($p=0,013$) e o Estadiamento Clínico T ($p=0,002$). As demais variáveis clínico-demográficas (idade, raça, tempo de evolução, postectomia, estágio e estágio clínico N) não se correlacionaram com a imunorreatividade da Desmoplakina (Tabela 11).

Tabela 11 - Imunorreatividade da Desmoplakina segundo as variáveis clínico-demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Desmoplakina (-)*	Desmoplakina(+)*	p(x ²)
		N (%)	N (%)	
Idade	Até 60 anos	150(83,3)	30(16,7)	0,727
	Mais que 60 anos	71(81,6)	16(18,4)	
Raça	Branca	174(83,3)	35(16,7)	0,692
	Não Branca	47(81,0)	11(19,0)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	91(79,8)	23(20,2)	0,269
	Mais que 6 meses	125(85,0)	22(15,0)	
Antecedentes venéris	Não	64(71,9)	25(28,1)	0,013
	Sim	70(87,5)	10(12,5)	
Postectomia	Não	174(83,3)	35(16,7)	0,466
	Sim	33(78,6)	9(21,4)	
Estadiamento cT	T1-T2	132(89,3)	16(10,7)	0,002
	T3-T4	88(74,6)	30(25,4)	
Estadiamento cN	N negativo	112(86,2)	18(13,8)	0,156
	N positivo	105(79,5)	27(20,5)	

*Excluídos os casos sem informação.

Dentre as variáveis anatomopatológicas apenas o Tipo Histológico ($p=0,070$) se correlacionou com a expressão da Desmoplakina. Não houve associação entre as demais variáveis anatomopatológicas (Grau de diferenciação tumoral, espessura, permeação vascular-linfática, infiltração peri-neural, infiltração de corpos

cavernosos, infiltração de corpos esponjosos, infiltração da uretra, coilocitose e tipo de invasão tecidual) e a expressão da Desmoplakina. (Tabela 12).

Tabela 12 - Imunorreatividade da Desmoplakina segundo as variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Desmoplakina (-)* N (%)	Desmoplakina (+)* N (%)	p(x ²)
Diferenciação	Grau I	60(80,0)	15(20,0)	0,454
	Grau II-III	161(83,9)	31(16,1)	
Espessura tumoral	Até 5mm	54(81,8)	12(18,2)	0,864
	>5mm	163(82,7)	34(17,3)	
Permeação vascular-linfática	Não	148(80,9)	35(19,1)	0,560
	Sim	58(84,1)	11(15,9)	
Infiltração peri-neural	Não	140(81,9)	31(18,1)	0,940
	Sim	66(81,5)	15(18,5)	
Infiltração de corpo cavernoso	Não	54(73,0)	20(27,0)	0,187
	Sim	106(80,9)	25(19,1)	
Infiltração de corpo Esponjoso	Não	18(81,8)	4(18,2)	1,000
	Sim	164(82,8)	34(17,2)	
Infiltração de uretra	Não	87(81,3)	20(18,7)	0,439
	Sim	59(76,6)	18(23,4)	
Coilocitose	Ausente	44(84,6)	8(15,4)	0,279
	Presente	49(76,6)	15(23,4)	
Tipo de Invasão	Regular	51(78,5)	14(21,5)	0,482
	Irregular	150(82,4)	32(17,6)	
Tipo Histológico	Baixo risco	45(75,0)	15(25,0)	0,070
	Alto risco	176(85,0)	31(15,0)	

*Excluídos os casos sem informação.

7.1.3 Imunoistoquímica da Plakoglobina

A imunorreatividade da Plakoglobina (considerando 50% de área positiva) foi positiva em 234 (82,1%) e negativa em 51 (17,9%). Não houve correlação entre a imunorreatividade da Plakoglobina com as variáveis clínico-demográficas (Idade, Raça, Tempo de Evolução, Antecedentes Venéreos Postectomia, Estádio clínico T e Estádio clínico N) (Tabela 13).

Tabela 13 - Imunorreatividade da Plakoglobina segundo as variáveis clínico-demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Plakoglobina (-)* N (%)	Plakoglobina(+)* N (%)	p(x ²)
Idade	Até 60 anos	35(18,3)	156(81,7)	0,787
	Mais que 60 anos	16(17,0)	78(83,0)	
Raça	Branca	40(18,2)	180(81,8)	0,816
	Não Branca	11(16,9)	54(83,1)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	20(16,3)	103(83,7)	0,521
	Mais que 6 meses	30(19,2)	126(80,8)	
Antecedentes venéreos	Não	22(23,2)	73(76,8)	0,782
	Sim	18(21,4)	66(78,6)	
Postectomia	Não	42(18,8)	182(81,2)	0,120
	Sim	4(9,1)	40(90,9)	
Estadiamento cT	T1-T2	29(18,0)	132(82,0)	0,953
	T3-T4	22(17,7)	102(82,3)	
Estadiamento cN	N negativo	23(17,2)	111(82,8)	0,663
	N positivo	28(19,2)	118(80,8)	

*Excluídos os casos sem informação.

Não houve associação entre as variáveis anatomopatológicas (Grau de diferenciação tumoral, espessura, permeação vascular-linfática, infiltração peri-neural, infiltração de corpos cavernosos, infiltração de corpos esponjosos, infiltração

da uretra, coilocitose e tipo de invasão tecidual e tipo histológico) e a expressão da Plakoglobina. (Tabela 14).

Tabela 14 - Imunorreatividade da Plakoglobina segundo as variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Plakoglobina (-)* N (%)	Plakoglobina (+)* N (%)	p(x ²)
Diferenciação	Grau I	11(14,1)	67(85,9)	0,305
	Grau II-III	40(19,3)	167(80,7)	
Espessura tumoral	Até 5mm	11(15,3)	61(84,7)	0,464
	>5mm	40(19,1)	169(80,9)	
Permeação vascular-linfática	Não	35(17,9)	160(82,1)	0,817
	Sim	14(19,2)	59(80,8)	
Infiltração peri-neural	Não	37(20,4)	144(79,6)	0,187
	Sim	12(13,8)	75(86,2)	
Infiltração de corpo cavernoso	Não	12(16,0)	63(84,0)	0,305
	Sim	31(21,8)	111(78,2)	
Infiltração de corpo Esponjoso	Não	4(18,2)	18(81,8)	0,980
	Sim	39(18,4)	173(81,6)	
Infiltração de uretra	Não	28(24,8)	85(75,2)	0,154
	Sim	13(16,2)	67(83,8)	
Coilocitose	Ausente	9(16,7)	45(83,3)	0,859
	Presente	11(15,5)	60(84,5)	
Tipo de Invasão	Regular	13(18,3)	58(81,7)	0,924
	Irregular	34(17,8)	157(82,2)	
Tipo Histológico	Baixo risco	12(19,0)	51(81,0)	0,787
	Alto risco	39(17,7)	183(82,4)	

*Excluídos os casos sem informação.

7.1.4 Imunoistoquímica da Desmogleina

A imunorreatividade da Desmogleina (considerando 50% de área positiva) foi positiva em 114 (40,3%) e negativa em 169 (59,7%). Não houve correlação entre a imunorreatividade da Desmogleina com as variáveis clínico-demográficas (Idade,

Raça, Tempo de Evolução, Antecedentes Venéreos Postectomia, Estádio clínico T e Estádio clínico N) (Tabela 15).

Tabela 15 - Imunorreatividade da Desmogleina segundo as variáveis clínico-demográficas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Desmogleina (-)*	Desmogleina (+)*	p(x ²)
		N (%)	N (%)	
Idade	Até 60 anos	121(63,4)	70(36,6)	0,073
	Mais que 60 anos	48(52,2)	44(47,8)	
Raça	Branca	135(61,6)	84(38,4)	0,222
	Não Branca	34(53,1)	30(46,9)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	74(60,7)	48(39,3)	0,743
	Mais que 6 meses	91(58,7)	64(41,3)	
Antecedentes venéreos	Não	54(57,4)	40(42,6)	0,719
	Sim	46(54,8)	38(45,2)	
Postectomia	Não	134(60,1)	89(39,9)	0,494
	Sim	24(54,5)	20(45,5)	
Estadiamento cT	T1-T2	92(57,9)	67(42,1)	0,471
	T3-T4	77(62,1)	47(37,9)	
Estadiamento cN	N negativo	79(59,4)	54(40,6)	0,826
	N positivo	88(60,7)	57(39,3)	

*Excluídos os casos sem informação.

Dentre as variáveis anatomopatológicas avaliadas apenas a infiltração de corpos cavernosos (p=0,022) se correlacionou com a expressão imunoistoquímica da Desmogleina. Não houve associação entre as demais variáveis anatomopatológicas (Grau de diferenciação tumoral, espessura, permeação vascular-linfática, infiltração peri-neural, infiltração de corpos esponjosos, infiltração da uretra, coilocitose e tipo de invasão tecidual e o tipo histológico) e a expressão imunoistoquímica da Desmogleina. (Tabela 16).

Tabela 16 - Imunorreatividade da Desmogleína segundo as variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Desmogleína (-)* N (%)	Desmogleína (+)* N (%)	p(x ²)
Diferenciação	Grau I	43(55,1)	35(44,9)	0,332
	Grau II-III	126(61,5)	79(38,5)	
Espessura tumoral	Até 5mm	45(62,5)	27(37,5)	0,595
	>5mm	122(58,9)	85(41,1)	
Permeação vascular-linfática	Não	113(58,2)	81(41,8)	0,673
	Sim	44(61,1)	28(38,9)	
Infiltração Peri-neural	Não	106(59,2)	73(40,8)	0,984
	Sim	52(59,1)	36(40,9)	
Infiltração de corpo cavernoso	Não	33(44,0)	42(56,0)	0,022
	Sim	85(60,3)	56(39,7)	
Infiltração de corpo Esponjoso	Não	13(59,1)	9(40,9)	0,980
	Sim	123(58,0)	89(42,0)	
Infiltração de uretra	Não	60(53,1)	53(46,9)	0,545
	Sim	46(57,5)	34(42,5)	
Coilocitose	Ausente	35(63,6)	20(36,4)	0,292
	Presente	38(54,3)	32(45,7)	
Tipo de Invasão	Regular	46(65,7)	24(34,3)	0,172
	Irregular	107(56,3)	83(43,7)	
Tipo Histológico	Baixo risco	40(63,5)	23(36,5)	0,488
	Alto risco	129(58,6)	91(41,4)	

*Excluídos os casos sem informação.

7.2 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASES LINFONODAIS

7.2.1 Análise univariada

Dentre as variáveis clínico-demográficas avaliadas, as que se associaram com a presença de metástase linfonodal na análise univariada foi a Idade (p=0,040); o estadiamento clínico T (p=0,023) e o estadiamento clínico N (p<0,001) (Tabela 17).

Tabela 17 - Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Linfonodo negativo n (%)	Linfonodo positivo n (%)	p(x ²)
Idade	Até 60 anos	137(70,6)	57(29,4)	0,040**
	Mais que 60 anos	77(81,9)	17(18,1)	
Raça	Branca	166(74,6)	57(25,6)	0,923
	Não Branca	48(73,8)	17(26,2)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	89(72,4)	34(27,6)	0,475
	Mais que 6 meses	121(76,1)	38(23,9)	
Antecedentes venérios*	Não	67(70,5)	28(29,5)	0,393
	Sim	64(76,2)	20(23,8)	
Postectomia*	Não	167(73,6)	60(26,4)	0,607
	Sim	34(77,3)	10(22,7)	
Estadiamento cT*	T1-T2	128(79,5)	33(20,5)	0,023**
	T3-T4	86(67,7)	41(32,3)	
Estadiamento cN*	N negativo	124(92,5)	10(7,5)	<0,001**
	N positivo	86(57,7)	63(42,3)	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Dentre as variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas as seguintes associaram-se significativamente com a presença de metástases linfonodais na análise univariada: Grau tumoral ($p < 0,001$), permeação vasculo-linfática ($p < 0,001$), infiltração perineural ($p < 0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p = 0,001$), infiltração da uretra ($p = 0,004$), o tipo de invasão ($p = 0,040$), tipo histológico ($p = 0,003$), imunorreatividade da Involucrina ($p = 0,001$) e a imunorreatividade da Plakoglobina ($p = 0,036$). (Tabela 18).

Tabela 18 - Status linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímica dos 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Linfonodo negativo n (%)	Linfonodo positivo n (%)	p(x ²)
Diferenciação*	Grau I	77(97,5)	2(2,5)	<0,001**
	Grau II-III	137(65,6)	72(34,4)	
Espessura tumoral*	Até 5mm	59(79,7)	15(20,3)	0,187**
	>5mm	151(71,9)	59(28,1)	
Permeação vascular-linfática *	Não	156(79,6)	40(20,4)	<0,001**
	Sim	53(57,3)	32(42,7)	
Infiltração peri-neural *	Não	160(88,4)	21(11,6)	<0,001**
	Sim	39(43,3)	51(56,7)	
Infiltração de corpo cavernoso*	Não	64(85,3)	11(14,7)	0,001**
	Sim	91(62,8)	54(37,2)	
Infiltração de corpo esponjoso*	Não	20(90,9)	2(9,1)	0,075**
	Sim	157(73,7)	56(26,3)	
Infiltração de uretra*	Não	92(81,4)	21(18,6)	0,004**
	Sim	51(63,0)	30(37,0)	
Infiltração de órgãos adjacentes*	Não	196(73,4)	71(26,6)	1,000
	Sim	3(75,0)	1(25,0)	
Coilocitose*	Presente	30(53,6)	26(46,4)	0,309
	Ausente	45(62,5)	27(37,5)	
Tipo de invasão*	Regular	59(83,1)	12(16,9)	0,040**
	Irregular	137(70,6)	57(29,4)	
Tipo Histológico	Baixo risco	56(88,9)	7(11,1)	0,003**
	Alto risco	158(70,2)	67(29,8)	
INVOLUCRINA*	Negativo (até 25%)	33(57,9)	24(42,1)	0,001**
	Positivo (>25%)	178(78,8)	48(21,2)	
DESMOPLAKINA*	Negativo (até 10%)	171(77,4)	50(22,6)	0,082**
	Positivo (>10%)	30(65,2)	16(34,8)	
PLAKOGLOBINA*	Negativo (até 50%)	44(86,3)	7(13,7)	0,036**
	Positivo (>50%)	169(72,2)	65(27,8)	
DESMOGLEINA*	Negativo (até 50%)	123(72,8)	46(27,2)	0,403
	Positivo (>50%)	88(77,2)	26(22,8)	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

7.2.2 Análise multivariada

A lista das variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 são listadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p(x ²)
Grau de Diferenciação	<0,001
Permeação linfo-vascular	<0,001
Infiltração Peri-neural	<0,001
Estádio cN	0,001
Infiltração de corpo cavernoso	0,001
Involucrina	0,001
Tipo Histológico	0,003
Infiltração da Uretra	0,004
Estádio cT	0,023
Plakoglobina	0,036
Tipo de invasão	0,040
Idade	0,040
Infiltração de corpo esponjoso	0,075
Desmoplakina	0,082
Espessura tumoral	0,187

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o Grau histológico (RR = 17,219; IC 95% [3,786 – 78,321]), Infiltração perineural (RR = 7,250; IC 95% [3,577 – 14,693]) e estágio clínico N (RR = 7,429; IC 95% [3,292 – 16,764]), foram fatores independentes de risco para o comprometimento metastático dos linfonodos (Tabela 20).

Tabela 20 - Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal em 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variáveis	Categoria	RR	IC 95%
Grau Tumoral	Não	1	Ref.
	Sim	17,219	3,786 – 78,321
Infiltração Peri-neural	Negativo	1	Ref.
	Positivo	7,250	3,577 – 14,693
Estádio cN	Positivo	1	Ref.
	Negativo	7,429	3,292 – 17,764

7.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

7.3.1 Sobrevida câncer específica

- **Análise univariada**

A taxa de sobrevida câncer específica em 5 anos da população estudada foi de 83,8%, como mostrado na Figura 9.

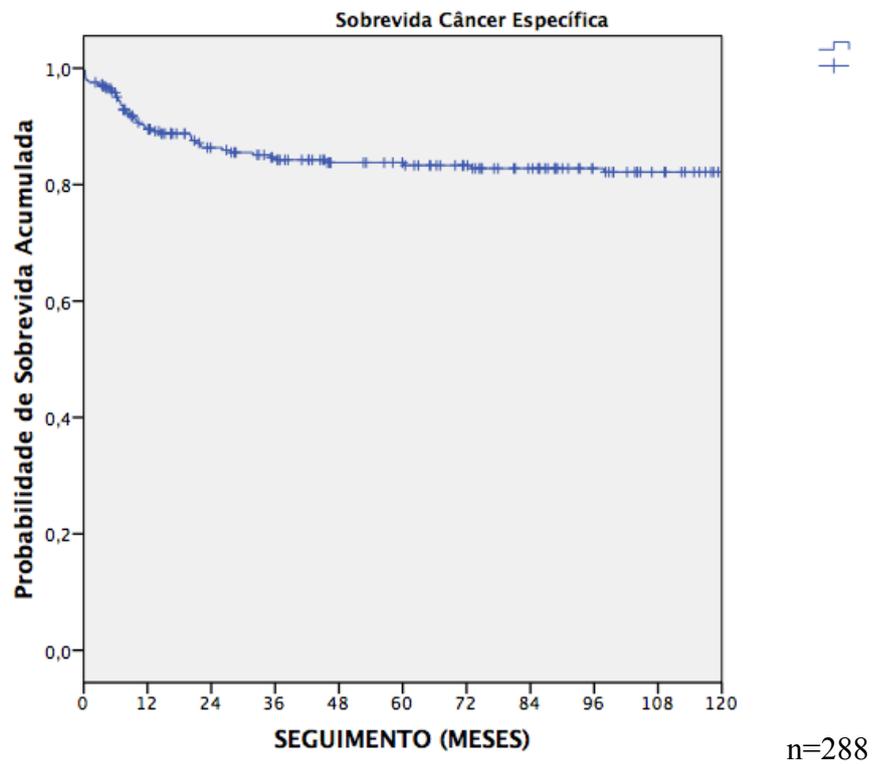


Figura 17 - Curva de sobrevida câncer específica para os 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciou significativamente a sobrevida câncer específica foi o estadiamento clínico T ($p=0,010$) e o estadiamento clínico N ($p<0,001$) (Tabela 21).

Tabela 21 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida câncer específica 5 anos (%)	p(log rank)
Idade	Até 60 anos	194	82,2	0,381
	> 60 anos	94	87,1	
Raça	Branca	233	84,5	0,224
	Não Branca	65	81,3	
Tempo de evolução	Até 6 meses	123	81,3	0,801
	> 6 meses	159	85,8	
Antecedentes venérios	Não	95	86,6	0,907
	Sim	84	85,9	
Estadiamento cT	T1-T2	161	89,3	0,010**
	T3-T4	127	76,4	
Estadiamento cN	N negativo	134	93,0	<0,001**
	N positivo	149	74,8	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para a regressão de COX.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica estão: grau de diferenciação histológica ($p < 0,001$), espessura tumoral ($p = 0,014$), permeação linfo-vascular ($p = 0,024$), infiltração perineural ($p < 0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p = 0,003$), presença de metástase linfonodal ($p < 0,001$) e tipo histológico ($p = 0,032$) (Tabela 22).

Tabela 22 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N	Sobrevida câncer específica 5 anos (%)	p(log rank)
Diferenciação	Grau I	79	96,1	<0,001**
	Grau II-III	209	78,8	
Espessura tumoral*	Até 5mm	74	91,3	0,014**
	>5mm	210	80,9	
Permeação linfo-vascular*	Não	196	87,5	0,024**
	Sim	75	73,3	
Embolização perineural*	Não	181	91,8	<0,001**
	Sim	90	65,8	
Infiltração de corpo * cavernoso	Não	75	94,2	0,003**
	Sim	145	77,9	
Infiltração de corpo * esponjoso	Não	22	95,0	0,149**
	Sim	213	83,8	
Infiltração de uretra*	Não	113	88,6	0,141**
	Sim	81	77,6	
Infiltração de órgãos* adjacentes	Não	267	83,4	0,668
	Sim	4	66,7	
Coilocitose*	Ausente	56	74,5	0,145**
	Presente	72	83,3	
Tipo de invasão*	Regular	71	88,1	0,260
	Irregular	194	82,6	
Tipo Histológico	Baixo risco	63	91,8	0,032**
	Alto risco	225	81,4	
Metástase linfonodal*	Não	214	92,5	<0,001**
	Sim	74	53,6	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão de COX.

Apenas a imunorreatividade para Involucrina (p=0,049) apresentou significância estatística para a sobrevida câncer específica (Tabela 23).

Tabela 23- Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com a gradação imunoistoquímica de Involucrina, Desmogleína, Plakoglobina e Desmoplakina em 288 portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida câncer específica 5 anos (%)	p(log rank)
INVOLUCRINA	Negativo ($\leq 25\%$)	57	75,1	0,049**
	Positivo ($>25\%$)	226	86,1	
DESMOPLAKINA	Negativo ($\leq 10\%$)	221	84,2	0,478
	Positivo ($>10\%$)	46	89,5	
PLAKOGLOBINA	Negativo ($\leq 50\%$)	51	85,7	0,541
	Positivo ($>50\%$)	234	83,7	
DESMOGLEINA	Negativo ($\leq 10\%$)	169	81,7	0,349
	Positivo ($>10\%$)	114	86,4	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão de COX.

- Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida câncer específica, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 24).

Tabela 24 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	P
Metástase linfonodal	<0,001
Grau de diferenciação	<0,001
Infiltração perineural	<0,001
Estádio clínico N	<0,001
Infiltração de corpo cavernoso	0,003
Estádio clínico T	0,010
Espessura tumoral	0,014
Permeação linfo-vascular	0,024
Tipo Histológico	0,032
Involucrina	0,049
Infiltração da uretra	0,141
Coilocitose	0,145
Infiltração de corpo esponjoso	0,149

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, metástase linfonodal (RR = 5,65; IC 95% [3,04 – 10,51]), Grau de diferenciação tumoral (RR = 3,39; IC 95% [1,00 – 11,41]) e espessura tumoral (RR = 2,60; IC 95% [1,10 – 6,16]), foram fatores independentes de risco para a sobrevida câncer específica (Tabela 25).

Tabela 25 – Modelo multivariado para a sobrevida câncer específica em pacientes portadores de carcinoma peniano em 288 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Metástase linfonodal	Não	1	Ref.
	Sim	5,65	3,04 – 10,51
Grau de diferenciação	Não	1	Ref.
	Sim	3,39	1,00 – 11,41
Espessura tumoral	Não	1	Ref.
	Sim	2,60	1,10 – 6,16

7.3.2 Sobrevida Global

- **Análise univariada**

A taxa de sobrevida Global em 5 e 10 anos da população estudada foi de 75,3% e 59,2%, como mostrado na Figura 18.

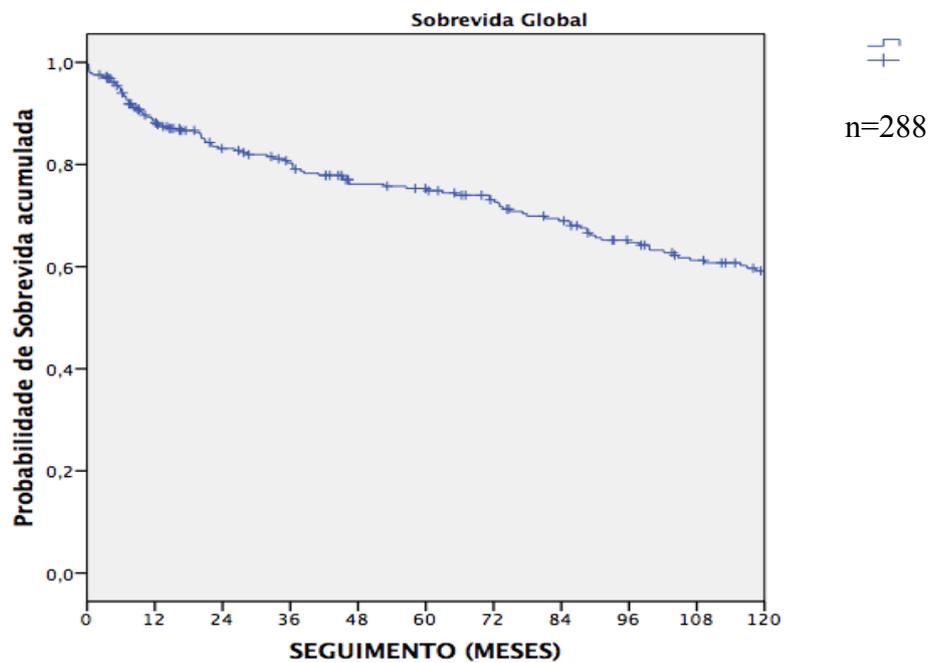


Figura 18 - Curva de sobrevida Global para os 288 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciou significativamente a sobrevida Global foi a Idade ($p < 0,001$) o estadiamento clínico T ($p = 0,024$) e o estadiamento clínico N ($p = 0,002$) (Tabela 26).

Tabela 26 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida Global em 5 anos (%)	p(log rank)
Idade	Até 60 anos	194	77,9	<0,001**
	> 60 anos	94	70,6	
Raça	Branca	223	75,1	0,396
	Não Branca	65	76,2	
Tempo de evolução	Até 6 meses	123	72,7	0,780
	> 6 meses	159	77,1	
Antecedentes venérios	Não	95	80,4	0,655
	Sim	84	75,4	
Estadiamento cT	T1-T2	161	79,3	0,024**
	T3-T4	127	69,9	
Estadiamento cN	N negativo	134	82,7	0,002**
	N positivo	149	68,1	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para a regressão de COX.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida Global estão: grau de diferenciação histológica ($p < 0,001$), espessura tumoral ($p = 0,035$), permeação linfo-vascular ($p < 0,001$), embolização perineural ($p < 0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p = 0,008$), tipo histológico ($p = 0,013$) e presença de metástase linfonodal ($p < 0,001$) (Tabela 27).

Tabela 27 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N	Sobrevida Global em 5 anos (%)	p(log rank)
Diferenciação	Grau I	79	92,0	<0,001**
	Grau II-III	209	68,6	
Espessura tumoral*	Até 5mm	74	81,8	0,035**
	>5mm	210	72,4	
Permeação linfo-vascular*	Não	196	82,0	<0,001**
	Sim	75	55,2	
Embolização perineural*	Não	181	83,3	<0,001**
	Sim	90	57,7	
Infiltração de corpo * cavernoso	Não	75	87,2	0,008**
	Sim	145	67,2	
Infiltração de corpo * esponjoso	Não	22	90,5	0,078**
	Sim	213	75,5	
Infiltração de uretra*	Não	113	80,2	0,083**
	Sim	81	66,1	
Infiltração de órgãos* adjacentes	Não	267	75,0	0,883
	Sim	4	66,7	
Coilocitose*	Ausente	56	66,8	0,236
	Presente	72	70,7	
Tipo de invasão*	Regular	71	83,7	0,092**
	Irregular	194	72,9	
Tipo Histológico	Baixo risco	63	84,9	0,013**
	Alto risco	225	72,5	
Metástase linfonodal*	Não	214	84,5	<0,001**
	Sim	74	44,1	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão de COX.

A imunorreatividade para Involucrina (p=0,225), Desmogleina (p=0,059) Plakoglobina (p=0,175) e Desmoplakina (p=0,893) não apresentaram significância estatística para a Sobrevida Global (Tabela 28).

Tabela 28 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com a gradação imunoistoquímica de Involucrina, Desmogleina, Plakoglobina e Desmoplakina em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida Global em 5 anos (%)	p(log rank)
INVOLUCRINA	Negativo ($\leq 25\%$)	57	70,6	0,225
	Positivo ($>25\%$)	226	77,3	
DESMOPLAKINA	Negativo ($\leq 10\%$)	221	75,6	0,893
	Positivo ($>10\%$)	46	84,5	
PLAKOGLOBINA	Negativo ($\leq 50\%$)	51	76,8	0,175**
	Positivo ($>50\%$)	234	65,6	
DESMOGLEINA	Negativo ($\leq 10\%$)	169	75,4	0,059**
	Positivo ($>10\%$)	114	75,2	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão de COX.

- **Análise multivariada**

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para Sobrevida Global, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 29).

Tabela 29 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	P
Idade	<0,001
Metástase linfonodal	<0,001
Grau de diferenciação	<0,001
Infiltração perineural	<0,001
Permeação linfo-vascular	<0,001
Estádio clínico N	0,002
Tipo Histológico	0,013
Estádio clínico T	0,024
Infiltração de corpo cavernoso	0,008
Espessura tumoral	0,035
Desmogleina	0,059
Infiltração de corpo esponjoso	0,078
Infiltração da Uretra	0,083
Plakoglobina	0,175

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, Idade (RR = 2,68; IC 95% [1,85 – 3,88]), metástase linfonodal (RR = 2,58; IC 95% [1,65 – 4,01]), Grau de diferenciação tumoral (RR = 1,72; IC 95% [1,11 – 2,66]) e embolização perineural (RR = 1,77; IC 95% [1,17 – 2,68]), foram fatores independentes para risco de óbito (Tabela 30).

Tabela 30 - Risco de óbito em 288 pacientes portadores de carcinoma peniano. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Idade	Até 60 anos	1	Ref.
	> 60 anos	2,68	1,85 – 3,88
Metástase linfonodal	Não	1	Ref.
	Sim	2,58	1,65 – 4,01
Grau de diferenciação	Não	1	Ref.
	Sim	1,72	1,11 – 2,66
Embolização perineural	Não	1	Ref.
	Sim	1,77	1,17 – 2,68

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

8.1 ASPECTOS GERAIS

O câncer do pênis é uma neoplasia mutilante com grande impacto emocional e físico para os pacientes afetados. Rara nos países desenvolvidos, apresenta elevada incidência em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Desta forma a maioria dos trabalhos com casuísticas suficientes para identificar fatores de risco para a ocorrência de metástases vem de estudos multiinstitucionais ou de países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996a).

Apresenta pico de incidência entre a 4^a e 7^a décadas de vida. Nesta série, a média de idade foi de 54 (dp=13,4) e mediana de 53 anos, sendo que 67,4% dos pacientes apresentavam menos de 60 anos. Na série de HORENBLAS e VAN TINTERE (1994), apenas 29% apresentavam menos de 60 anos. A elevada incidência de pacientes mais jovens nesta série talvez se deva as grandes diferenças geográficas existentes no Brasil e baixo nível sócio-econômico dos pacientes analisados, baixa frequência de postectomias (fator protetor) e conseqüente precário nível de higiene pessoal e acesso dificultado a assistência médica.

As más condições de higiene, a fimose e a presença de prováveis substâncias irritativas no esmegma são características comuns a grande maioria dos pacientes portadores de câncer do pênis e fatores já bem definidos na etiopatogenia desta neoplasia (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; BRINTON et al. 1991;

LOPES et al. 1993). A realização da postectomia nesta série foi de 15,3% (44 pacientes), sendo que em apenas 13 (4,5%) esta foi realizada sem relação com o tumor primário. Alguns autores relatam que a incidência de câncer de pênis entre os indivíduos que não foram submetidos a circuncisão é de 3,3% contra 0% naqueles a realizaram ao nascimento (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967).

A queixa principal neste grupo foi ferida no pênis, referida por 92,0% dos pacientes, fato semelhante a outras séries (ORNELLAS et al. 1994; ADEYOUJU et al. 1997).

Dentre os fatores anatomopatológicos bastante estudados, a profundidade de invasão é bastante discutido. HALL et al. (1998) relataram que tumores com profundidade maior que 5 mm apresentavam maior incidência de metástases linfonodais. LOPES et al. (1996b) mostraram que tumores com espessura de 5mm apresentavam maior risco de metástase linfonodal apenas na análise univariada ($p=0,02$). Nesta série, a profundidade de invasão medida em até 5 mm e maior que 5 mm não foi estatisticamente significativa na análise univariada ($p=0,187$) para o risco de metástase linfonodal.

A presença de embolo linfo-vascular nesta série, foi estatisticamente significativa na análise univariada ($p<0,001$) porém não permanecendo na multivariada para o risco de metástase linfonodal. A presença de invasão vascular por células neoplásicas foi fator prognóstico significativo nos estudos de FRALEY et al. (1989), LOPES et al. (1996b) e de SLATON et al. (2001).

Apesar de existirem controvérsias, a maioria dos autores relata que o grau de diferenciação celular é outro fator importante no câncer do pênis, tanto em relação a incidência de metástases linfonodais, como em relação à sobrevida global

(SRINIVAS et al. 1987; POMPEU 1993, SLATON et al. 2001). Pacientes com tumores pouco diferenciados tem mais metástases e pior sobrevida que aqueles com lesões bem diferenciadas (FRALEY et al. 1985; SOLSONA et al. 1992; HORENBLAS et al. 1993; HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994; ORNELLAS et al. 1994; SLATON et al. 2001). SOLSONA et al. (2001) mostraram risco de metástase linfonodal para pacientes com grau 1 de diferenciação de 15%, contra 67% para grau 2 e 75% para o grau 3. Em nossa o grau de diferenciação foi variável significativa para o risco de metástase ($p < 0,001$) e para a sobrevida câncer específica e sobrevida global.

A presença de doença mais avançada (estádios clínicos T3 e T4) em 44,1% dos casos determinou um grande número de amputações totais nesta série (108 pacientes) e a presença de metástases linfonodais em 25,7% dos casos (74/288). Se excluídos os 146 pacientes em que não se realizou linfadenectomia este índice vai para 52,1% (74/142). O alto índices de falsos positivos e de falsos negativos ao exame clínico, justificam a realização das linfadenectomias inguinais ou ilioinguinais de princípio até que novos métodos de estadiamento mais confiáveis possam modificar esta evolução. Esta conduta resulta em alto índice de linfadenectomias provavelmente desnecessárias e submete estes pacientes a altas taxas de morbidade (CATALONA 1980; HORENBLAS et al. 1991).

HORENBLAS et al. (2000), aplicando o princípio dinâmico do linfonodo sentinela utilizou a linfocintilografia pré-operatória com dextran marcado com tecnécio e auxiliado no intra-operatório por um “*gama-probe*”, mostrando um alto índice de acerto na determinação da primeira instância linfonodal de possível disseminação metastática. Neste estudo apenas um caso houve um resultado falso

negativo. Recentemente TANIS et al. (2002), do mesmo grupo, avaliando 90 pacientes, relataram um índice de falso negativo de 22%, mostrando uma sensibilidade para o método de 80%, deixando dúvidas sobre a eficiência do mesmo.

Uma alternativa para selecionar pacientes em que seriam justificáveis tratamentos mais agressivos, seria a identificação de fatores prognósticos no tumor primário capaz de predizer a presença de metástase linfonodal. Embora fatores clínicos e anatomopatológicos tenha certo valor prognóstico, é a presença de metástase linfonodal o fator mais importante na evolução e sobrevida (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977; NARAYAMA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996a).

SUFRIN e HUBEN (1987) estudaram a sobrevida de várias séries e encontraram sobrevida global de 51,6%. Considerando-se pacientes com linfonodos metastáticos e não metastáticos, a sobrevida a 5 anos foi de 27,5 e 66,2% respectivamente. Da mesma forma HORENBLAS e VAN TITEREN (1984), mostraram índices de sobrevida de 50 e 93% em 5 anos para pacientes com e sem metástases linfonodais, enquanto SRINIVAS et al. (1987) apresentaram índices de 28 e 74% respectivamente. Na nossa série, a sobrevida câncer específica em 5 anos para pacientes com e sem metástase linfonodal foi de 92,5 e 53,6% e a sobrevida global em 5 anos foi de 84,5% e 44,1%.

As taxas de metástases à distância em câncer de pênis variam de 1 a 10% (HORENBLAS et al. 1993; BEGGS e SPRATT 1964; LOPES et al. 1996a), fato este, muito interessante, já que se esperaria incidência maior de metástases hematogênicas em tumores infiltrativos em um órgão altamente vascularizado.

Como os fatores clínicos ou anatomopatológicos isoladamente não têm sido capazes de prever o risco de metástase linfonodal nos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de pênis, nem na época do diagnóstico bem como no seu seguimento, novos estudos associando-se fatores clássicos a elementos da biologia molecular são uma opção na tentativa de selecionar pacientes com maior risco de metástases linfonodais os quais devem ser tratados de princípio e definir aqueles de baixo risco para metástase, diminuindo a morbidade da terapêutica.

Na nossa análise, foram avaliados além de fatores clínico, demográficos e anatomopatológicos clássicos, o tipo de invasão segundo critérios modificados de ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989) que utilizaram com resultados animadores em câncer da cavidade oral, chegando a uma nova gradação de malignidade como indicador prognóstico. Em trabalho prévio do nosso grupo (GUIMARÃES et al. 2006) foi definido dois padrões de infiltração, um padrão de infiltração “regular” onde as células neoplásicas parecem empurrar as células do estroma, e um padrão de invasão do tipo “irregular”, onde as células tumorais invadem permeando o estroma em cordões tumorais. Esta variável anatomopatológica apresentou significância estatística, na análise univariada ($p=0,040$) porém não permaneceu na multivariada para o risco de metástase linfonodal.

8.2 IMUNOISTOQUÍMICA DA INVOLUCRINA

A Involucrina, um conhecido marcador molecular de diferenciação em carcinoma de células escamosas, apesar de extensamente investigado em vários

tumores, não havia sido avaliado em câncer de pênis. A única citação sobre a sua expressão em câncer de pênis foi realizada por TSUKAMOTO (1989), no estabelecimento e caracterização de uma linhagem celular de câncer peniano, obtida através de cultura de tecido de células recuperadas de uma metástase linfonodal, onde descreve que esta linhagem celular (KU-8) manteve as características de células epiteliais, mantendo a expressão de varias proteínas, inclusive da Involucrina.

Devido a falta de uma referencia para se considerar qual a porcentagem de expressão para se considerar a marcação como positiva, ou negativa, foi considerado os valores de quartis na tentativa se encontrar um valor que melhor se aplicasse ao referido marcador com a metodologia aplicada.

Alguns autores avaliaram a positividade da marcação da Involucrina em câncer de Mama e utilizaram 10% de positividade como referência (TSUDA et al. 1997) e correlacionaram com maior recorrência local com a baixa expressão da Involucrina e menos metástase óssea com expressão $\geq 10\%$. Porém a maioria dos trabalhos que analisou a expressão da Involucrina como fator prognóstico utilizaram avaliação qualitativa ou semi-qualitativa (ASAMOTO et al. 1989; NAIR et al 1996), mostrando relação com diferenciação e em alguns casos com prognóstico (NAIR et al. 1996).

Quanto a positividade da marcação da Involucrina, foi considerada como ponto de corte 25% de área marcada, como positiva. Em 226 casos (79,9%) a marcação foi positiva e negativa em 51 (20,1%) e a expressão da Involucrina se deu sem relação com as variáveis clinico demográficas avaliadas (idade, raça, tempo de evolução, antecedentes venéreos, postectomia, estágio clínico T e estágio clinico N).

Entretanto a sua expressão foi correlacionada com algumas das variáveis anatomopatológicas avaliadas, como: o grau de diferenciação tumoral ($p < 0,001$); a presença de infiltração peri-neural ($p=0,002$) e infiltração de corpos cavernosos ($p=0,021$) e a presença de coilocitose ($p=0,006$) e o tipo histológico ($p=0,043$) mas não com espessura, permeação vascular-linfática, infiltração de corpos esponjosos, infiltração da uretra, e tipo de invasão tecidual.

Era de se esperar que a imunexpressão da Involucrina estivesse correlacionada com o grau de diferenciação celular e com o tipo histológico, já que por ser um marcador molecular de diferenciação, que deve estar expresso durante a diferenciação do epitélio normal, a sua expressão deve estar diminuída em casos pouco diferenciados e com histologia mais agressiva, como demonstrado neste material. Da mesma forma que a sua correlação com infiltração perineural e infiltração de corpos cavernosos, que estão correlacionados com agressividade e estágio, respectivamente.

Estudos recentes demonstram que a expressão da proteína E2 do HPV pode levar a alteração de genes celulares e virais em câncer de colo uterino (BURNS et al. 2010). Em estudo recente analisando o efeito da infecção por HPV em uma linhagem celular de queratinócitos HaCat, BURNS et al. (2010) demonstrou aumento da apoptose além da alteração na expressão da involucrina, além de outras proteínas relacionadas com características morfológicas, fato que explica a sua correlação com coilocitose neste amostra.

8.3 IMUNOISTOQUÍMICA DA DESMOPLAKINA

A desmoplakina, um dos membros da família das plakinas, também tem sido estudada em sua relação com neoplasias. A perda da desmoplakina foi relacionada a progressão em várias neoplasias (CHIDGEY 2002) e alguns autores acreditam que esta habilidade esteja associada a interação da Desmoplakina e outros componentes desmossômicos com vias de sinalização intracelular como a via WNT/ β -catenina (CHIDGEY 2002; GARCIA-GRAS et al. 2006).

Da mesma forma que a involucrina, a desmoplakina, também não foi estudada em câncer de pênis, o que dificulta a identificação de um valor de corte para a sua positividade, bem como a comparação dos resultados. Mesmo quando se compara a outras neoplasias os resultados também são escasso e de difícil comparação devido a múltiplas metodologias utilizadas.

Várias proteínas plakinas, incluindo desmoplakina, plectina, envoplakina e periplakina, se localizam nos desmossomos. Destes, apenas a desmoplakina é obrigatória para a adesão desmossomal normal. Duas isoformas da desmoplakina que são geradas por “splicing” alternativo de um único transcrito são conhecidas. Estes diferem apenas no tamanho de um domínio central da haste que separa os domínios globulares N-terminal e C-terminal. Está estabelecido que o domínio N-terminal da desmoplakina se liga a plakoglobina e a plakofilina, enquanto o seu domínio C-terminal interage com filamentos intermediários (GETSIOS et al. 2004).

Devido a esta necessidade de manutenção da Desmoplakina para a adesão desmossomal normal, neste trabalho a imunorreatividade da desmoplakina foi considerando positiva a partir de 10% de células coradas, sendo então positiva em 46

(17,2%) e negativa em 221 (82,8%). Devido ao grande número de casos com imunorreatividade negativa é possível que a perda da expressão da Desmoplakina seja um evento inicial na gênese do carcinoma peniano.

Houve correlação entre a imunorreatividade da desmoplakina apenas com antecedentes venéreos ($p=0,13$) e o Estadiamento Clínico T ($p=0,002$). Sendo que a sua positividade foi mais freqüente em tumores mais avançados (estádios T3 e T4). Corroborando seu papel não só na gênese, mas também na progressão desta neoplasia.

As demais variáveis clínico-demográficas (idade, raça, tempo de evolução, postectomia, estágio e estágio clínico N) não se correlacionaram com a imunorreatividade da desmoplakina.

Dentre as variáveis anatomopatológicas apenas o tipo histológico ($p=0,070$) se correlacionou com a expressão da desmoplakina. Neste caso, a imunorreatividade foi mais frequente nos casos com histologia favorável, o que condiz com a sua manutenção em casos menos agressivos mantendo a integridade tecidual com menor risco de metastatização.

Não houve associação entre as demais variáveis anatomopatológicas (Grau de diferenciação tumoral, espessura, permeação vascular-linfática, infiltração perineural, infiltração de corpos cavernosos, infiltração de corpos esponjosos, infiltração da uretra, coilocitose e tipo de invasão tecidual). Possivelmente por ser um evento inicial e necessário para a gênese e progressão não foi possível correlacioná-lo com prognóstico.

8.4 IMUNOISTOQUÍMICA DA PLAKOGLOBINA

A plakoglobina, também conhecida como δ -catenina, é um dos membros da famílias das proteínas “Armadillo”. É uma proteína citoplasmática e interage com as caderinas desmossômicas, Plakofilinas e a desmoplakina.

A desmoplakina é intimamente relacionada com a β -catenina, uma importante componente da via WNT/ β -catenina e ambas interagem com muitas outras proteínas. Na via canônica citoplasmática, a β -catenina é fosforilada pela glicogênio sintase quinase 3- β e orientada para a degradação proteossomal na ausência de um sinal da via Wnt.

Interação dos componentes Wnts com seus receptores bloqueiam a fosforilação da β -catenina e permite que esta se acumule no citoplasma e a sua translocação para o núcleo, onde ativa fatores de transcrição. Está bem estabelecido que o acúmulo e ativação imprópria de alvos transcricionais que ocorre como resultado de uma falha na degradação citoplasmática da β -catenina está associada com tumores em vários tecidos diferentes. (LI et al. 2006).

O papel da plakoglobina na via Wnt/ β -catenina, não é tão definida como aquele da β -catenina. Da mesma forma que a β -catenina, a superexpressão de plakoglobina é capaz de induzir a duplicação do eixo anterior de *Xenopus* (KARNOVSKY e KLYMKOWSKY 1995), sugerindo que ele tem uma atividade de sinalização parecida com a β -catenina. No entanto, a expressão de formas ancoradas de membrana da plakoglobina que mostram uma localização exclusivamente citoplasmática são incapazes de entrar no núcleo, também resulta em duplicação do eixo (MERRIAM et al. 1997). Isto levou à sugestão de que plakoglobina estimula a

via de sinalização da via Wnt/ β -catenina indiretamente através do bloqueio da degradação citoplasmática de β -catenina, permitindo a sua translocação para o núcleo.

Pode ser que plakoglobina seja na verdade um regulador negativo da via de sinalização Wnt/ β -catenina. A plakoglobina e β -catenina se ligam aos locais adjacentes, Tcf-4 e plakoglobina inibe a ligação do Tcf-4 ao DNA (MIRAVET et al. 2002). Assim a plakoglobina poderia reduzir a transcrição de genes-alvo Wnt pela ligação a Tcfs.

Em apoio a esta idéia, a supressão da expressão da desmoplakina em cardiomiócitos (usando RNA de interferência) leva a localização nuclear da plakoglobina e supressão da via de sinalização Wnt/ β -catenina. Este, por sua vez, leva a uma mudança transcricional de miogênese para adipogênese e acúmulo de gordura (GARCIA-GRAS et al. 2006).

A plakoglobina parece ter efeitos tanto positivos como negativos sobre o crescimento celular. A superexpressão da plakoglobina nas células epiteliais de rim de rato transformados promove o crescimento não regulado e formação de “foci” (KOLLIGS et al. 2000). Ao contrário da β -catenina, a plakoglobina é um forte ativador do c-myc, que é considerado essencial para a capacidade transformadora da plakoglobina. Outra sugestão é que plakoglobina causa crescimento não regulado e formação de “foci”, em células de carcinoma epidermóide, como resultado da indução do gene Bcl-2 e inibição da apoptose (HAKIMELAHI et al. 2000). Em apoio a esta idéia, mutações dentro ou perto do sítio de fosforilação do glicogênio sintase quinase-3 β foram descobertos em câncer de próstata hormônio refratário avançado, e estes coincidem com o forte acúmulo nuclear da plakoglobina e um

aumento concomitante da Bcl-2 (SHIINA et al. 2005). Pelo contrário, no câncer de próstata precoce, o que parece ser importante é a perda de expressão de plakoglobina, como resultado da perda de heterozigosidade (LOH) e hipermetilação do promotor plakoglobina. (SHIINA et al. 2005). Na verdade, a maioria dos estudos sugerem que plakoglobina tem um papel supressor de tumor. O gene plakoglobina apresenta LOH em câncer de mama e ovário (ABERLE et al. 1995) e perda de expressão de plakoglobina tem sido correlacionada com o resultado clínico ruim em inúmeros tumores, incluindo carcinoma não-pequenas células de pulmão (WINN et al. 2002).

Experimentos realizados “in vivo” e “in vitro” forneceram evidências adicionais de que plakoglobina suprime a proliferação. Transfecção de plakoglobina em células de linhagem neoplásica de bexiga que apresentam níveis reduzidos da proteína diminui a migração e suprime a capacidade das células para produzir tumores em camundongos (RIEGER-CHRIST et al. 2005). Do mesmo modo, re-expressão da plakoglobina em linhas de células cancerígenas do pulmão inibe o crescimento de células de crescimento independente de ancoragem em Agar (WINN et al. 2002).

Em geral, evidências apóiam claramente um papel para plakoglobina no câncer. Se isto está relacionado à sua participação nos desmossomos permanece obscuro. Pode ser que desmossomos sejam capazes de seqüestrar plakoglobina e assim regular a sua sinalização com a atividade da mesma maneira que junções aderentes são aparentemente capazes de modular a sinalização da β -catenina (GOTTARDI e GUMBINER 2001).

A imunorreatividade da Plakoglobina (considerando 50% de área positiva) foi positiva em 234 (82,1%) e negativa em 51 (17,9%). Não houve correlação entre a imunorreatividade da Plakoglobina com as variáveis clínico-demográficas (Idade, Raça, Tempo de Evolução, Antecedentes Venéreos Postectomia, Estádio clínico T e Estádio clínico N), e também não houve associação entre as variáveis anatomopatológicas (Grau de diferenciação tumoral, espessura, permeação vascular-linfática, infiltração peri-neural, infiltração de corpos cavernosos, infiltração de corpos esponjosos, infiltração da uretra, coilocitose e tipo de invasão tecidual e tipo histológico) e a expressão da Plakoglobina.

Apesar de não haver correlação da Plakoglobina com as variáveis clínicas e patológicas, ela esteve correlacionada com o risco de metástase linfonodal na análise univariada ($p=0,036$), corroborando a sua relação com prognóstico visto nos estudos em outros tumores.

8.5 IMUNOISTOQUÍMICA DA DESMOGLEINA

A imunorreatividade da Desmogleina (considerando 50% de área positiva) foi positiva em 114 (40,3%) e negativa em 169 (59,7%). Não houve correlação entre a imunorreatividade da Desmogleina com as variáveis clínico-demográficas (Idade, Raça, Tempo de Evolução, Antecedentes Venéreos Postectomia, Estádio clínico T e Estádio clínico N).

Dentre as variáveis anatomopatológicas avaliadas apenas a infiltração de corpos cavernosos ($p=0,022$) se correlacionou com a expressão imunoistoquímica da Desmogleina. Não houve associação entre as demais variáveis anatomopatológicas

(Grau de diferenciação tumoral, espessura, permeação vascular-linfática, infiltração peri-neural, infiltração de corpos esponjosos, infiltração da uretra, coilocitose e tipo de invasão tecidual e o tipo histológico) e a expressão imunohistoquímica da Desmogleína.

Muitos relatos na literatura tem documentado alterações na expressão das caderinas desmossômicas durante a tumorigênese, a perda da heterozigidade (LOH) na região do cluster do gene das caderinas desmossomais no cromossomo 18 foi observada no câncer de esôfago e de cabeça e pescoço (CHIDGEY 2002). Em alguns casos, os dados imunohistoquímicos são contraditórios e isso pode ser devido, pelo menos em parte, ao uso de anticorpos que não distinguem entre os diversos tipos de produtos de genes da desmocolina e desmogleína, fato este, que pode ser um dos motivos pelo qual não houve associação da imunorreatividade da desmogleína com os fatores estudados, bem como com o prognóstico nesta casuística.

Estudos recentes têm demonstrado perda de Dsg2 em câncer gástrico (BIEDERMANN et al. 2005; YASHIRO et al. 2006), DSC2 em câncer colorretal (KHAN et al. 2006) e Dsc3 no câncer de mama (como resultado da hipermetilação do promotor) (OSHIRO et al. 2005). Em contrapartida, a Dsg2 e Dsg3 estão superexpressas em carcinoma espinocelular da pele (KURZEN et al. 2003). Nesta amostra apesar de se considerar 50% de marcação como positivo, houve expressão diminuída (40,3% de positividade).

As alterações nos padrões de expressão de caderinas desmossômicas no câncer poderiam resultar na liberação de plakoglobina de desmossomos, com deslocamento subsequente da β -catenina de junções aderentes e aumentou da sinalização na via Wnt/ β -catenina.

Há outro possível resultado de mudanças na expressão de padrões de caderina desmossomal. A liberação de plakoglobina de desmossomos poderia resultar em sua translocação para o núcleo. Se isto promover a proliferação (estimulando a transcrição de genes como c-myc e Bcl-2) ou tem o efeito oposto (agindo como um regulador negativo da via de sinalização Wnt/ β -catenina) permanece incerto. Superexpressão de qualquer Dsg2 ou Dsg3 nas camadas suprabasais da epiderme murina também resulta em hiperproliferação de queratinócitos (MERRITT et al. 2002; BRENNAN et al. 2007).

Em geral, estes achados indicam que alterações na expressão de padrões de caderinas desmossomal, talvez através de sinalização intracelular e/ou alterações na resistência adesiva, tem efeitos fundamentais sobre o comportamento das células, podendo em algumas situações direcionar a proliferação.

Entretanto nesta séria a imunorreatividade da Desmogleína, não apresentou correlação significativa com os fatores clínico e patológicos estudados, bem como com o risco de meta linfonodal.

8.6 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASE LINFONODAL

Para a análise do risco de metástase linfonodal foram avaliados os parâmetros clínico-demográficos e anatomopatológicos do tumor primário, além da imunorreatividade para a Involucrina, e as proteínas da placa desmossômica.

Na análise univariada a idade menor que 60 anos ($p=0,040$) o estágio clínico T ($p=0,023$) e o estágio clínico N ($p<0001$), foram os únicos fatores clínico-demográfico associado com a presença de metástase linfonodal. Provavelmente o

fato de haver uma elevada porcentagem de pacientes abaixo de 60 anos nesta série, dado um pouco diferente da literatura, justifique a maior incidência de metástases linfonodal nesta série, bem como a alta incidência de tumores mais avançados avançado (T3 e T4 = 127 casos).

Os fatores anatomopatológicos com significância estatística na análise univariada foram: Grau tumoral ($p < 0,001$), permeação vascula-linfática ($p < 0,001$), infiltração perineural ($p < 0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p = 0,001$), infiltração da uretra ($p = 0,004$), o tipo de invasão ($p = 0,040$), tipo histológico ($p = 0,003$), imunorreatividade da Involucrina ($p = 0,001$) e a imunorreatividade da Plakoglobina ($p = 0,036$).

A manutenção da imunorreatividade da Involucrina e da Plakoglobina, como fatores independentes de risco para metástase linfonodal na análise univariada, condiz com os trabalhos da literatura que associam estes marcadores com diferenciação e pior prognóstico.

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o Grau histológico (RR = 17,219; IC 95% [3,786 – 78,321]), Infiltração perineural (RR = 7,250; IC 95% [3,577 – 14,693]) e estágio clínico N (RR = 7,429; IC 95% [3,292 – 16,764]), foram fatores independentes de risco para o comprometimento metastático dos linfonodos.

Na análise multivariada, a manutenção de grau histológico, infiltração perineural e estágio clínico N, como fatores independentes de risco de metástase linfonodal reforçam a importância destes fatores clínicos e patológicos no prognóstico dos tumores penianos. A não permanência do tipo Histológico, bem como da imunorreatividade da Involucrina e da Plakoglobina neste modelo, se deve, provavelmente à correlação destes marcadores com o grau histológico e a infiltração

perineural, que são expressões patológicas (fenotípicas) das alterações moleculares vistas representadas por estes marcadores.

Possivelmente estes marcadores podem desempenhar um papel importante em um sub-grupo de pacientes com carcinoma epidermoide penianos com estágio T1G3, ou mesmo naqueles T2G1, ou T2G2, sem metástases linfonodais para neste grupo ajudar a selecionar pacientes de alto risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais e ajudar na seleção daqueles candidatos a linfadenectomia profilática. Devido ao pequeno número destes casos nesta amostra, a análise desta hipótese fica prejudicada, merecendo futuros estudos multicêntricos para sua avaliação.

8.7 ANÁLISE DA SOBREVIDA

8.7.1 Sobrevida Câncer Específica

A taxa de sobrevida câncer específica em 5 anos foi de 83,8%.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciou significativamente a sobrevida câncer específica foi o estadiamento clínico T ($p=0,010$) e o estadiamento clínico N ($p<0,001$). Estas variáveis determinam o estágio clínico o que confirma a importância do TNM na avaliação das neoplasias, reforçando a importância de um exame físico realizado em um Hospital de referência.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica estão: grau de diferenciação histológica ($p<0,001$), espessura tumoral ($p= 0,014$), permeação linfo-vascular ($p=0,024$), infiltração

perineural ($p < 0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p = 0,003$), presença de metástase linfonodal ($p < 0,001$) e tipo histológico ($p = 0,032$), reforçando a importância anatomia clássica na avaliação desta neoplasia.

Em relação as variáveis imunoistoquímicas analisadas, apenas a imunorreatividade para Involucrina ($p = 0,049$) apresentou significância estatística para a sobrevida câncer específica. Como já relatado esta se associa com diferenciação, mostrando que pode ser uma variável útil na avaliação de carcinoma epidermoide do pênis.

8.7.2 Análise multivariada

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, metástase linfonodal (RR = 5,65; IC 95% [3,04 – 10,51]), Grau de diferenciação tumoral (RR = 3,39; IC 95% [1,00 – 11,41]) e espessura tumoral (RR = 2,60; IC 95% [1,10 – 6,16]), foram fatores independentes de risco para a sobrevida câncer específica.

8.8 SOBREVIDA GLOBAL

8.8.1 Análise univariada

A taxa de sobrevida Global em 5 e 10 anos da população estudada foi de 75,3% e 59,2%

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciou significativamente a sobrevida Global foi a Idade ($p < 0,001$) o estadiamento clínico T ($p = 0,024$) e o estadiamento clínico N ($p = 0,002$).

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida Global estão: grau de diferenciação histológica ($p < 0,001$), espessura

tumoral ($p= 0,035$), permeação linfo-vascular ($p<0,001$), embolização perineural ($p<0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p=0,008$), tipo histológico ($p=0,013$) e presença de metástase linfonodal ($p<0,001$)

A imunorreatividade para Involucrina ($p=0,225$), Desmogleina ($p=0,059$) Plakoglobina ($p=0,175$) e Desmoplakina ($p=0,893$) não apresentaram significância estatística para a Sobrevida Global.

8.8.2 Análise multivariada

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, Idade (RR = 2,68; IC 95% [1,85 – 3,88]), metástase linfonodal (RR = 2,58; IC 95% [1,65 – 4,01]), Grau de diferenciação tumoral (RR = 1,72; IC 95% [1,11 – 2,66]) e embolização perineural (RR = 1,77; IC 95% [1,17 – 2,68]), foram fatores independentes para risco de óbito

A presença de embolização perineural no modelo final reforça a sua importância como o fator prognóstico importante para a presença de metástase linfonodal, sendo uma variável que merece investigação em outras séries para comprovar o seu valor na sobrevida global.

A inclusão da idade no modelo final como fator independente para risco de óbito pela neoplasia é justificada pela incidência do carcinoma peniano preferencialmente em idoso, entre os quais o percentual de morte por outras causas também foi alto, além do grande seguimento deste grupo o que favorece a um alto índice de óbitos por outras causas não relacionadas ao tumor. Desta forma, esta variável ajusta o risco de óbito das outras variáveis pela idade.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo podemos concluir que:

1. Não houve associação entre os índices de imunorreatividade da Involucrina com as variáveis clínico-demográficas. Dentre as variáveis anatomopatológicas avaliadas apenas o Grau de diferenciação tumoral; a presença de infiltração peri-neural; infiltração de corpos cavernoso; a presença de coilocitose e o tipo Histológico se correlacionaram com a expressão da Involucrina.
2. A imunorreatividade da Involucrina se correlacionou com a presença de metástase linfonodal e a sobrevida câncer específica na análise univariada.
3. Houve correlação entre a imunorreatividade da Desmoplakina com as variáveis clínico-patológicas: Antecedentes Venéreos e o Estadiamento Clínico T. Dentre as variáveis anatomopatológicas apenas o Tipo Histológico se correlacionou com a expressão da Desmoplakina.
4. Não houve correlação entre a imunorreatividade da Plakoglobina com as variáveis clínico-demográficas ou com as variáveis anatomopatológicas. Porém se correlacionou na análise univariada com o risco de desenvolver metástase linfonodal.

5. Não houve correlação entre a imunorreatividade da Desmogleina com as variáveis clínico-demográficas. Dentre as variáveis anatomopatológicas avaliadas apenas a infiltração de corpos cavernosos se correlacionou com a expressão imunoistoquímica da Desmogleina.
6. A análise multivariada para o risco de metástase linfonodal mostrou o Grau histológico, a Infiltração perineural e estágio clínico N como variáveis independentes.
7. A análise multivariada para a Sobrevida câncer específica mostrou a metástase linfonodal, o Grau de diferenciação tumoral e espessura tumoral como fatores independentes de risco para a sobrevida câncer específica.
8. A análise multivariada para a Sobrevida Global mostrou a Idade, a metástase linfonodal, o Grau de diferenciação tumoral e embolização perineural, como fatores independentes para risco de óbito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Bierkamp C, Torchard D, et al. The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozygosity in breast and ovarian cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995; 92:6384-8.

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

Agarwal C, Efimova T, Welter JF, et al. CCAAT/enhancer-binding proteins. A role in regulation of human involucrin promoter response to phorbol ester. **J Biol Chem** 1999; 274:6190-4.

Alazawi WO, Morris LS, Stanley MA, Garrod DR, Coleman N. Altered expression of desmosomal components in high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Virchows Arch** 2003; 443:51-6.

Adhikary G, Crish JF, Gopalakrishnan R, Bone F, Eckert RL. Involucrin expression in the corneal epithelium: an essential role for Sp1 transcription factors. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2005; 46:3109-20.

Alcalai R, Metzger S, Rosenheck S, Meiner V, Chajek-Shaul T. A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair. **J Am Coll Cardiol** 2003; 42:319-27.

Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100(Suppl. 1):11830-5.

Alves G, Heller A, Fiedler W, et al. Genetics imbalances in 26 cases of penile squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 31:48-53

Amagai M, Karpati S, Klaus-Kovtun V, Udey MC, Stanley JR. The extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) mediates weak homophilic adhesion. **J Invest Dermatol** 1994; 102:402-8.

Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. **J Dermatol Sci** 1999; 20:92-102.

Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. **Nat Med** 2000; 6:1275-7.

Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M, Stanley JR. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. **J Invest Dermatol** 2002; 118:845-50.

Amar LS, Shabana AH, Oboeuf M, Martin N, Forest N. Involvement of desmoplakin phosphorylation in the regulation of desmosomes by protein kinase C, in HeLa cells. **Cell Adhes Commun** 1999; 7:125-38.

Andl CD, Stanley JR. Central role of the plakoglobin-binding domain for desmoglein 3 incorporation. **Dermatology** 2001; 117:1068-74.

Akat K, Mennel HD, Kremer P, Gassler N, Bleck CK, Kartenbeck J. Molecular characterization of desmosomes in meningiomas and arachnoidal tissue. **Acta Neuropathol (Berl)** 2003; 106:337-47.

Amitay R, Nass D, Meitar D, et al. Reduced expression of plakoglobin correlates with adverse outcome in patients with neuroblastoma. **Am J Pathol** 2001;159:43-9.

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

Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. **Eur J Immunol** 1999a; 29:2233-40.

Aoyama Y, Kitajima Y. Pemphigus vulgaris-IgG causes a rapid depletion of desmoglein 3 (Dsg3) from the Triton X-100 soluble pools, leading to the formation of Dsg3-depleted desmosomes in a human squamous carcinoma cell line, DJM-1 cells. **J Invest Dermatol** 1999b;112:67-71.

Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard HU. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. **Virology** 1996; 24:281-91.

Asamoto M, Fukushima S, Horike H, Tatemoto Y, Mori M. Involucrin expression in urinary bladder carcinoma. **Urol Res** 1989; 17:279-83.

Axcrona K, Brennhovd B, Andersen M, Berner A. Sarcomatoid squamous cell carcinoma of the penis. **Acta Oncol** 2010; 49:128-30.

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

Baker BH, Spratt LS Jr, Perez-Mesa C, Watson FR, Leduc RJ. Carcinoma of the penis. **J Urol** 1976; 116:458-61.

Balasubramanian S, Agarwal C, Efimova T, et al. Thapsigargin suppresses phorbol ester-dependent human involucrin promoter activity by suppressing CCAAT-enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) DNA binding. **Biochem J** 2000; 350:791-796.

Balasubramanian S, Efimova T, Eckert RL. Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. **J Biol Chem** 2002, 277:1828-36.

Banks EB, Crish JF, Welter JF, Eckert RL. Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements a role for Sp1 and AP1 binding sites. **Biochem J** 1998; 331:61-8.

Banks EB, Crish JF, Eckert RL. Transcription factor Sp1 activates involucrin promoter activity in non-epithelial cell types. **Biochem J** 1999; 337:507-12.

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

Bartlett JD, Luethy JD, Carlson SG, et al. Calcium ionophore A23187 induces expression of the growth arrest and DNA damage inducible CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBP)- related gene, gadd153. Ca²⁺ increases transcriptional activity and mRNA stability. **J Biol Chem** 1992; 267:20465-70.

Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3552-9.

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

Bezerra AL, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus DNA prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. **Am J Surg Pathol** 2001a; 25:673-8.

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

Biedermann K, Vogelsang H, Becker I, et al. Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. **J Pathol** 2005; 207:199-206.

Bierkamp C, McLaughlin KJ, Schwarz H, Huber O, Kemler R. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. **Dev Biol** 1996; 180:780-5.

Bikle DD, Ng D, Tu CL, et al. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. **Mol Cell Endocrinol** 2001; 177:161-71.

Bonne S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F. Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. **J Cell Sci** 1999; 112:2265-76.

Bonne S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green KJ, van Roy F. Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. **J Cell Biol** 2003; 161:403-16.

Bornslaeger EA, Godsel LM, Corcoran CM, et al. Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. **J Cell Sci** 2001; 114:727-38.

Brancolini C, Sgorbissa A, Schneider C. Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis. **Cell Death Differ** 1998; 5:1042-50.

Brennan D, Hu Y, Joubeh S, et al. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. **J Cell Sci** 2007; 120:758-71.

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

Broders AC. Epithelioma of the genito-urinary organs. **Ann Surg** 1922; 75:574-604.

Brumini R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos, 1976-80**. Rio de Janeiro: Campanha Nacional de Combate ao Câncer-Ministério da Saúde; 1982. Câncer de pênis; p.118-9.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignace grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 1989; 18:432-7.

Burdett ID, Sullivan KH. Desmosome assembly in MDCK cells: transport of precursors to the cell surface occurs by two phases of vesicular traffic and involves major changes in centrosome and Golgi location during a Ca(2+) shift. **Exp Cell Res** 2002; 276:296-309.

Burges JK, Badalement RA, Drago JR. Penile cancer: clinical presentation, diagnosis, and staging. **Urol Clin North Am** 1992; 19:247-56.

Burns JE, Walker HF, Schmitz C, Maitland NJ. Phenotypic effects of HPV-16 E2 protein expression in human keratinocytes. **Virology**. 2010; 401:314-21.

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

Calkins CC, Hoepner BL, Law CM, et al. The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. **J Biol Chem** 2003; 278:1774-83.

Calautti E, Cabodi S, Stein PL, Hatzfeld M, Kedersha N, Paolo Dotto G. Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell–cell adhesion. **J Cell Biol** 1998; 141:1449-65.

Calautti E, Grossi M, Mammucari C, et al. Fyn tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell–cell adhesion. **J Cell Biol** 2002; 156:137-48.

Caldelari R, de Bruin A, Baumann D, et al. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. **J Cell Biol** 2001; 153:823-34.

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

Canes D, Chiang GJ, Billmeyer BR, et al. Histone deacetylase inhibitors upregulate plakoglobin expression in bladder carcinoma cells and display antineoplastic activity in vitro and in vivo. **Int J Cancer** 2005; 113:841-8.

Cassel TN, Nord M. C/EBP transcription factors in the lung epithelium. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2003; 285:L773-81.

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

Charpentier E, Lavker RM, Acquista E, Cowin P. Plakoglobin suppresses epithelial proliferation and hair growth in vivo. **J Cell Biol** 2000; 149:503-20.

Chaux A, Soares F, Rodríguez I, et al. Papillary squamous cell carcinoma, not otherwise specified (NOS) of the penis: clinicopathologic features, differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **Am J Surg Pathol** 2010a; 34:223-30.

Chaux A, Tamboli P, Ayala A, et al. Warty-basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm: report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010b; 23:896-904.

Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. **J Biol Chem** 2002; 277:10512-22.

Chidgey MA, Yue KK, Gould S, Byrne C, Garrod DR. Changing pattern of desmocollin 3 expression accompanies epidermal organisation during skin development. **Dev Dyn** 1997; 210:315-27.

Chidgey M. Desmosomes and disease: an update. **Histol Histopathol** 2002; 17:1179-92.

Chidgey M, Dawson C. Desmosomes: a role in cancer? **Br J Cancer** 2007; 96:1783-7.

Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe LT, Green KJ, Weis WI. Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmolakin reveal a unique repeat motif structure. **Nat Struct Biol** 2002; 9:612-20.

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

Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. **Cell** 1989; 57:201-9.

Courey AJ, Tjian R. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. **Cell** 1988; 55:887-98.

Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP, Tjian R. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. **Cell** 1989; 59:827-36.

Cox DR. Regression models and life table. **J R Stat Soc Br** 1972; 34:187-220.

Crish JF, Howard JM, Zaim TM, et al. Tissue-specific and differentiation-appropriate expression of the human involucrin gene in transgenic mice: An abnormal epidermal phenotype. **Differentiation** 1993; 53:191-200.

Crish JF, Zaim T, Eckert RL. The distal regulatory region (DRR) of the human involucrin promoter is required for expression in epidermis. **J Biol Chem** 1998; 273:30460-5.

Crish JF, Bone F, Banks EB, Eckert RL. The human involucrin gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation. **Oncogene** 2002; 21:3826-31.

Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Riveros M. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis: a prospective study of 66 cases. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:753-63.

Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, et al. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:755-61.

Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S, Young RH. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. **Int J Surg Pathol** 2001; 9:111-20.

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

Dai B, Ye DW, Kong YY, Yao XD, Zhang HL, Shen YJ. Predicting regional lymph node metastasis in Chinese patients with penile squamous cell carcinoma: the role of histopathologic classification, tumor stage and depth of invasion. **J Urol** 2006; 176:1431-1435.

Dean AL Jr. Epithelioma of the penis. **J Urol** 1935; 33:252-83.

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

Demlehner MP, Schafer S, Grund C, Franke WW. Continual assembly of half-desmosomal structures in the absence of cell contacts and their frustrated endocytosis: a coordinated Sisyphus cycle. **J Cell Biol** 1995; 131:745-60.

Denning MF, Guy SG, Ellerbroek SM, Norvell SM, Kowalczyk AP, Green KJ. The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum, and protein kinase C. **Exp Cell Res** 1998; 239:50-9.

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

Deucher A, Efimova T, Eckert RL. Calcium-dependent involucrin expression is inversely regulated by protein kinase C (PKC)alpha and PKCdelta. **J Biol Chem** 2002; 277:17032-40.

Duden R, Franke WW. Organization of desmosomal plaque proteins in cells growing at low calcium concentrations. **J Cell Biol** 1988; 107:1049-63.

Eckert RL, Green H. Structure and evolution of the human involucrin gene. **Cell** 1986; 46:583-9.

Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, et al. Involucrin structure and role in envelope assembly. **J Invest Dermatol** 1993; 100:613-7.

Eckert RL, Welter JF. Epidermal keratinocytes genes and their regulation. **Cell Death Differ** 1996; 3:373-83.

Eckert RL, Crish JF, Robinson NA. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. **Physiol Rev** 1997a; 77:397-424.

Eckert RL, Crish JF, Banks EB, Welter JF. The epidermis: Genes on genes off. **J Invest Dermatol** 1997b; 109:501-9.

Eckert RL, Crish JF, Efimova T, et al. Regulation of involucrin gene expression. **J Invest Dermatol** 2004; 123:13-22.

Eckhart L, Declercq W, Ban J, et al. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. **J Invest Dermatol** 2000; 115:1148-51.

Elias PM, Matsuyoshi N, Wu H, et al. Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function. **J Cell Biol** 2001; 153:243-9.

Eshkind L, Tian Q, Schmidt A, Franke WW, Windoffer R, Leube RE. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. **Eur J Cell Biol** 2002; 81:592-8.

Fawcett TW, Eastman HB, Martindale JL, Holbrook NJ. Physical and functional association between GADD153 and CCAAT/enhancer-binding protein beta during cellular stress. **J Biol Chem** 1996; 271:14285-9.

Fleming TP, Garrod DR, Elsmore AJ. Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation embryo. **Development** 1991; 112:527-39.

Fontao L, Favre B, Riou S, et al. Interaction of the bullous pemphigoid antigen 1 (BP230) and desmoplakin with intermediate filaments is mediated by distinct sequences within their COOH terminus. **Mol Biol Cell** 2003; 14:1978-92.

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

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

Frew IDO, Jefferies JD, Swinney J. Carcinoma of the penis. **Br J Urol** 1967; 39:398-404.

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

Gallicano GI, Kouklis P, Bauer C, et al. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. **J Cell Biol** 1998; 143:2009-22.

Gambardella L, Barrandon Y. The multifaceted adult epidermal stem cell. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:771-7.

Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, et al. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **J Clin Invest** 2006; 116:2012-21.

Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z. Desmosomal cadherins. **Curr Opin Cell Biol** 2002; 14:537-45.

Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated betacatenin in skin. **Cell** 1998; 95:605-14.

Gaudry CA, Palka HL, Dusek RL, et al. Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. **J Biol Chem** 2001; 276:24871-80.

Gentil F, Lima EW, Abrão A. Melanoma of the penis. report of 2 cases. **Rev Bras Cir** 1965; 50:183-9.

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

Getsios S, Huen AC, Green KJ. Working out the strength and flexibility of desmosomes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2004; 5:271-81.

Gloeckler-Reis LA, Hankey BF, Edwards BK. **Cancer Statistic Review 1973-1987**. Bethesda: National Institute of Health; 1990. (National Institute of Health Publication n° 90-2789).

Gloushankova NA, Wakatsuki T, Troyanovsky RB, Elson E, Troyanovsky SM. Continual assembly of desmosomes within stable intercellular contacts of epithelial A-431 cells. **Cell Tissue Res** 2003; 314:399-410.

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

Gottardi CJ, Gumbiner BM. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. **Curr Biol** 2001; 11:R792-4.

Green H. The keratinocyte as differentiated cell type. **Harvey Lectures** 1980, 74:101-39.

Greene FL, Page D, Morrow M, et al. **AJCC Manual de estadiamento do câncer**. 6th ed. New York: Springer; 2002. Pênis; p.317-22.

Guerrero D, Guarch R, Ojer A, et al. Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. **BJU Int** 2008; 102:747-55.

Guimarães GC, Rodrigues De Souza R, et al. Penile metastasis of chondrosarcoma of the jaw. **Urology** 2003; 61:837.

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

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

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

Gursel EO, Georgountzos C, Uson AC, Melicow MM, Veenema RJ. Penile cancer: clinicopathology study of 64 cases. **Urology** 1973; 1:569-78.

Hadchouel J, Carvajal JJ, Daubas P, et al. Analysis of a key regulatory region upstream of the Myf5 gene reveals multiple phases of myogenesis, orchestrated at each site by a combination of elements dispersed throughout the locus. **Development** 2003; 130:3415-26.

Hakimelahi S, Parker HR, Gilchrist AJ, et al. Plakoglobin regulates the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2. **J Biol Chem** 2000; 275:10905-11.

Hall MC, Sanders JS, Vuitch F, Ramirez E, Pettaway CA. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and traditional pathologic variables in invasive penile carcinoma assessment of prognostic significance. **Urology** 1998; 52:11-6.

Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. **J Cell Sci** 2000; 113:1803-11.

Hanakawa Y, Selwood T, Woo D, Lin C, Schechter NM, Stanley JR. Calcium-dependent conformation of desmoglein 1 is required for its cleavage by exfoliative toxin. **J Invest Dermatol** 2003; 121:383-9.

Hankins CL, Kotwal S, Majumder S, Weston P, Phipps A, Anathhanam AJ. Multifocal melanoma of the glans penis. **Plast Reconstr Surg** 2006; 118:33e-8e.

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

Hatsell S, Medina L, Merola J, Haltiwanger R, Cowin P. Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. **J Biol Chem** 2003; 278:37745-52.

Hatzfeld M. The armadillo family of structural proteins. **Int Rev Cytol** 1999; 186:179-224.

Hatzfeld M, Green KJ, Sauter H. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. **J Cell Sci** 2003; 116:1219-33.

He W, Cowin P, Stokes DL. Untangling desmosomal knots with electron tomography. **Science** 2003; 302:109-13.

Hegarty PK, Kayes O, Freeman A, Christopher N, Ralph DJ, Minhas S. A prospective study of 100 cases of penile cancer managed according to European Association of Urology guidelines. **BJU Int** 2006; 98:526-31.

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behavior? **Br Med J** 1987; 1295:1306-8.

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

Heyns CF, Van Vollenhoven P, Steenkamp JW, et al. Carcinoma of the penis-appraisal of a modified tumor-staging system. **Br J Urol** 1997; 80:307-12.

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

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

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

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

Hu P, Berkowitz P, O'Keefe EJ, Rubenstein DS. Keratinocyte adherens junctions initiate nuclear signaling by translocation of plakoglobin from the membrane to the nucleus. **J Invest Dermatol** 2003; 121:242-51.

Huber O. Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. **Cell Mol Life Sci** 2003; 60:1872-90.

Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. **J Cell Biol** 2000; 148:567-78.

Huen AC, Park JK, Godsel LM, et al. Intermediate filament-membrane attachments function synergistically with actin-dependent contacts to regulate intercellular adhesive strength. **J Cell Biol** 2002; 159:1005-17.

Hunt DM, Sahota VK, Taylor K, et al. Clustered cadherin genes: a sequence-ready contig for the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18. **Genomics** 1999; 62:445-55.

Ishii K, Norvell SM, Bannon LJ, Amargo EV, Pascoe LT, Green KJ. Assembly of desmosomal cadherins into desmosomes is isoform dependent. **J Invest Dermatol** 2001; 117:26-35.

Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and *in situ* hybridization. **J Urol** 1993; 149:59-63.

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

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

Jones JCR, Goldman RD. Intermediate filaments and the initiation of desmosome assembly. **J Cell Biol** 1985; 101:506-17.

Kajava AV. Alpha-helical solenoid model for the human involucrin. **FEBS Lett** 2000; 473:127-31.

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

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

Karnovsky A, Klymkowsky MW. Anterior axis duplication in *Xenopus* induced by the over-expression of the cadherin-binding protein plakoglobin. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995; 92:4522-6.

Katona TM, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Cheng L, Montironi R, Cheng L. Soft tissue tumors of the penis: a review. **Anal Quant Cytol Histol**. 2006; 28:193-206.

Khan K, Hardy R, Haq A, Ogunbiyi O, Morton D, Chidgey M. Desmocollin switching in colorectal cancer. **Br J Cancer** 2006; 95:1367-70.

Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. **Cell** 2003; 113:249-60.

Klymkowsky MW, Williams BO, Barish GD, Varmus HE, Vourgourakis YE. Membrane-anchored plakoglobins have multiple mechanisms of action in Wnt signaling. **Mol Biol Cell** 1999;10:3151-69.

Klymkowsky MW. Plakophilin, armadillo repeats, and nuclear localization. **Microsc Res Tech** 1999; 45:43-54.

Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, et al. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. **J Cell Biol** 1997; 137:1091-2.

Kodama S, Ikeda S, Asahara T, Kishida M, Kikuchi A. Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. **J Biol Chem** 1999; 274:27682-8.

Koeser J, Troyanovsky SM, Grund C, Franke WW. De novo formation of desmosomes in cultured cells upon transfection of genes encoding specific desmosomal components. **Exp Cell Res** 2003; 285:114-30.

Kofron M, Spagnuolo A, Klymkowsky M, Wylie C, Heasman J. The roles of maternal alpha-catenin and plakoglobin in the early *Xenopus* embryo. **Development** 1997; 124:1553-60.

Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM, et al. Gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. **Genes Dev** 2000; 14:1319-31.

Kouklis PD, Hutton E, Fuchs E. Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. **J Cell Biol** 1994; 127:1049-60.

Kowalczyk AP, Palka HL, Luu HH, et al. Posttranslational regulation of plakoglobin expression. Influence of the desmosomal cadherins on plakoglobin metabolic stability. **J Biol Chem** 1994; 269:31214-23.

Kowalczyk AP, Borgwardt JE, Green KJ. Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. **J Invest Dermatol** 1996; 107:293-300.

Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Borgwardt JE, et al. The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. **J Cell Biol** 1997; 139:773-84.

Kroon BK, Horenblas S, Estourgie SH, Lont AP, Valdes Olmos RA, Nieweg OE. How to avoid false-negative dynamic sentinel node procedures in penile carcinoma. **J Urol** 2004; 171:2191-4.

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

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.

Kroon BK, Leijte JA, van Boven H, et al. Microarray gene-expression profiling to predict lymph node metastasis in penile carcinoma. **BJU Int** 2008; 102:510-5.

Kurzen H, Munzing I, Hartschuh W. Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. **J Cutan Pathol** 2003; 30:621-30.

Lazo ND, Downing DT. A mixture of alpha-helical and 3(10)-helical conformations for involucrin in the human epidermal corneocyte envelope provides a scaffold for the attachment of both lipids and proteins. **J Biol Chem** 1999, 274:37340-4.

Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S. Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. **J Biol Chem** 1999; 274:21464-70.

Leung CL, Green KJ, Liem RK. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. **Trends Cell Biol** 2002; 12:37-45.

Lewis JE, Wahl III JK, Sass KM, Jensen PJ, Johnson KR, Wheelock MJ. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. **J Cell Biol** 1997; 136:919-34.

Li A, Simmons PJ, Kaur P: Identification and isolation of candidate human Keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998, 95:3902–3907.

Li F, Chong ZZ, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. **Histol Histopathol** 2006; 21:103-24.

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

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

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

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

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

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

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

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

Lorch JH, Klessner J, Park JK, Getsios S, Wu YL, Stack MS, Green KJ. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intracellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. **J Biol Chem** 2004; 279:37191-200.

Lowe D, McKee PH. Verrucous carcinoma of the penis(BuschKe-Lowenstein Tumor): a clinicopathological study. **Br J Urol** 1983; 55:427-9.

Maatta A, DiColandrea T, Groot K, Watt FM. Gene targeting of envoplakin, a cytoskeletal linker protein and precursor of the epidermal cornified envelope. **Mol Cell Biol** 2001; 21:7047-53.

Maeda O, Usami N, Kondo M, et al. Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. **Oncogene** 2004; 23:964-72.

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

Marcozzi C, Burdett ID, Buxton RS, Magee AI. Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. **J Cell Sci** 1998; 111:495-509.

Martins ACP, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci Jr S. Immunoeexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. **J Urol** 2002; 167:89-93.

Mattey DL, Garrod DR. Calcium-induced desmosome formation in cultured kidney epithelial cells. **J Cell Sci** 1986a; 85:95-111.

Mattey DL, Garrod DR. Splitting and internalization of the desmosomes of cultured kidney epithelial cells by reduction in calcium concentration. **J Cell Sci** 1986b; 85:113-24.

McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. **Int J Cancer** 1986; 37:55-9.

McGrath JA. Hereditary diseases of desmosomes. **J Dermatol Sci** 1999; 20:85-91.

McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). **Lancet** 2000; 355:2119-24.

McMillan JR, Shimizu H. Desmosomes: structure and function in normal and diseased epidermis. **J Dermatol** 2001; 28:291-8.

Meng J-J, Bornslaeger EA, Green KJ, Steinert PM, Ip W. Two hybrid analysis reveals fundamental differences in direct interactions between desmoplakin and cell type specific intermediate filaments. **J Biol Chem** 1997; 272:21495-503.

Menon GK, Grayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. **J Invest Dermatol** 1985; 84:508-12.

Merriam JM, Rubenstein AB, Klymkowsky MW. Cytoplasmically anchored plakoglobin induces a WNT-like phenotype in *Xenopus*. **Dev Biol** 1997; 185:67-81.

Merritt AJ, Berika MY, Zhai W, et al. Suprabasal desmoglein 3 expression in the epidermis of transgenic mice results in hyperproliferation and abnormal differentiation. **Mol Cell Biol** 2002; 22:5846-58.

Millar SE, Willert K, Salinas PC, et al. WNT signaling in the control of hair growth and structure. **Dev Biol** 1999; 207:133-49.

Miller JR, Moon RT. Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in *Xenopus*. **J Cell Biol** 1997; 139:229-43.

Miravet S, Piedra J, Miro F, Itarte E, Garcia de Herreros A, Dunach M. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for b-catenin and plakoglobin. **J Biol Chem** 2002; 277:1884-91.

Miravet S, Piedra J, Castano J, et al. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. **Mol Cell Biol** 2003; 23:7391-402.

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

Moll I, Kurzen H, Langbein L, Franke WW. The distribution of the desmosomal protein, plakophilin 1, in human skin and skin tumors. **J Invest Dermatol** 1997; 108:139-46.

Monzon RI, LaPres JJ, Hudson LG. Regulation of involucrin gene expression by retinoic acid and glucocorticoids. **Cell Growth Differ** 1996; 7:1751-9.

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

Muller J, Ritt DA, Copeland TD, Morrison DK. Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. **EMBO J** 2003; 22:4431-42.

Nair SA, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK, Pillai MR. Involucrin and tumor progression in the uterine cervix. **Pathobiology** 1996; 64:333-8.

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

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

Nicolau SM, Camargo CG, Stávale JN, et al. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. **Urology** 2005; 65:251-5.

Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, et al. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. **Hum Mol Genet** 2000; 9:2761-6.

North AJ, Chidgey MA, Clarke JP, Bardsley WG, Garrod DR. Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded distributions in bovine. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:7701-5.

North AJ, Bardsley WG, Hyam J, et al. Molecular map of the desmosomal plaque. **J Cell Sci** 1999; 112:4325-36.

Nuber UA, Schafer S, Schmidt A, Koch PJ, Franke WW. The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. **Eur J Cell Biol** 1995; 66:69-74.

Ogata K, Sato K, Tahirov T. Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: Cooperativity from near and afar. **Curr Opin Struct Biol** 2003; 13:40-8.

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

Osada K, Seishima M, Kitajima Y, Pemphigus. IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. **J Invest Dermatol** 1997; 108:482-7.

Oshiro MM, Kim CJ, Wozniak RJ, et al. Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer. **Breast Cancer Res** 2005; 7:R669-80.

Palka HL, Green KJ. Roles of plakoglobin end domains in desmosome assembly. **J Cell Sci** 1997; 110:2359-71.

Pascal E, Tjian R. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. **Genes Dev** 1991; 5:1646-56.

Pasdar M, Nelson WJ. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. I. Biochemical analysis. **J Cell Biol** 1988a; 106:677-85.

Pasdar M, Nelson WJ. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell–cell contact. II. Morphological analysis. **J Cell Biol** 1988b; 106:687-95.

Pasdar M, Nelson WJ. Regulation of desmosome assembly in epithelial cells: kinetics of synthesis, transport, and stabilization of desmoglein I, a major protein of the membrane core domain. **J Cell Biol** 1989; 109:163-77.

Pasdar M, Krzeminski KA, Nelson WJ. Regulation of desmosome assembly in MDCK epithelial cells: coordination of membrane core and cytoplasmic plaque domain assembly at the plasma membrane. **J Cell Biol** 1991; 113:645-55.

Pasdar M, Li Z, Chlumecky V. Plakoglobin: kinetics of synthesis, phosphorylation, stability, and interactions with desmoglein and E-cadherin. **Cell Motil Cytoskelet** 1995a; 32:258-72.

Pasdar M, Li Z, Chan H. Desmosome assembly and disassembly are regulated by reversible protein phosphorylation in cultured epithelial cells. **Cell Motil Cytoskelet** 1995b; 30:108-21.

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

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

Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. **EMBO J** 1999; 18:1738-47.

Persky L. Epidemiology of cancer of the penis. **Rec Results Cancer Res** 1997; 60:97-109.

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

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

Poumay Y, Herphelin F, Smits P, et al. High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. **Mol Cell Biol Res Commun** 1999; 2:138-44.

Protzel C, Knoedel J, Zimmermann U, Woenckhaus C, Poetsch M, Giebel J. Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. **Histol Histopathol** 2007; 22:1197-204.

Protzel C, Kakies C, Kleist B, Poetsch M, Giebel J. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. **Virchows Arch** 2008; 452:369-75.

Pulkkinen L, Choi YW, Kljuic A, Uitto J, Mahoney MG. Novel member of the mouse desmoglein gene family: Dsg1-beta. **Exp Dermatol** 2003;12:11-9.

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

Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, et al. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **Am J Hum Genet** 2002; 71:1200-6.

Rice RH, Green H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: Activation of the cross-linking by calcium ions. **Cell** 1979; 18:681-94.

Rieger-Christ KM, Ng L, Hanley RS, et al. Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential. **Br J Cancer** 2005; 92:2153-9.

Ritchie AW, Foster PW, Fowler S. Penile cancer in the UK. Clinical presentation and outcome in 1998/99. **BJU Int** 2004; 94:1248-252.

Robinson NA, LaCelle PT, Eckert RL. Involucrin is a covalently crosslinked constituent of highly purified epidermal corneocytes: evidence for a common pattern of involucrin crosslinking in vivo and in vitro. **J Invest Dermatol** 1996; 107:101-7.

Robinson NA, Lopic S, Welter JF, Eckert RL. S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. **J Biol Chem** 1997; 272:12035-46.

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

Rosen ED. The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology. **Ann N Y Acad Sci** 2002; 979:143-58.

Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, et al. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. **J Cell Biol** 1996; 135:215-25.

Runswick SK, O'Hare MJ, Jones L, Streuli CH, Garrod DR. Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. **Nat Cell Biol** 2001; 3:823-30.

Sadot E, Simcha I, Iwai K, Ciechanover A, Geiger B, Ben-Ze'ev A. Differential interaction of plakoglobin and beta-catenin with the ubiquitin-proteasome system. **Oncogene** 2000; 19:1992-2001.

Saisorn I, Lawrentschuk N, Leewansangtong S, Bolton DM. Fine-needle aspiration cytology predicts inguinal lymph node metastasis without antibiotic pretreatment in penile carcinoma. **BJU Int** 2006; 97:1225-8.

Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. **J Urol** 1992; 147:389-92.

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

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

Schmidt A, Langbein L, Rode M, Pratzel S, Zimbelmann R, Franke WW. Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. **Cell Tissue Res** 1997; 290:481-99.

Serre G, Mils V, Haftek M, et al. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. **J Invest Dermatol** 1991; 97:1061-72.

Shiina H, Breault JE, Basset WW, et al. Functional Loss of the gamma-catenin gene through epigenetic and genetic pathways in human prostate cancer. **Cancer Res** 2005; 65:2130-8.

Simcha I, Shtutman M, Salomon D, et al. Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. **J Cell Biol** 1998; 141:1433-48.

Simon M, Jonca N, Guerrin M, et al. Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. **J Biol Chem** 2001; 276:20292-9.

Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. **J Urol** 2001; 156:1138-42.

Smith EA, Fuchs E. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. **J Cell Biol** 1998; 141:1229-41.

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

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

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

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

Srougi M, Simon SD. **Câncer urológico**. São Paulo: Platina; 1990. Cancer do pênis; p.439-60.

Stappenbeck TS, Green KJ. The desmoplakin carboxyl terminus coaligns with and specifically disrupts intermediate filament networks when expressed in cultured cells. **J Cell Biol** 1992; 116:1197-209.

Stappenbeck TS, Lamb JA, Corcoran CM, Green KJ. Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. **J Biol Chem** 1994; 269:29351-4.

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

Steinert PM, Marekov LN. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide crosslinked component of the keratinocyte cornified cell envelope. **J Biol Chem** 1997, 272:2021-30.

Steinert PM, Marekov LN. Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. **Mol Biol Cell** 1999, 10:4247-61.

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

Sun W, Zhang PL, Herrera GA. p53 protein and Ki-67 overexpression in urothelial dysplasia of bladder. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:327-31.

Suske G. The Sp-family of transcription factors. **Gene** 1999; 238:291-300.

Tanis PJ, Lont AP, Meinhardt W, et al. Dynamic sentinel node biopsy for penile cancer: reliability of a staging technique. **J Urol** 2002; 168:76-80.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al: Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. **Cell** 2000; 102:451-61.

Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, et al. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. **Agents Actions** 1989; 27:17-23.

Thastrup O, Cullen PJ, Brobak BK, et al. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endo-plasmic reticulum Ca²⁺ p -APTase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:2466-70.

Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, et al. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. **Mol Cell** 2002; 10:1453-65.

Troyanovsky SM, Troyanovsky RB, Eshkind LG, Leube RE, Franke WW. Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:10790-4.

Tselepis C, Chidgey M, North A, Garrod D. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:8064-9.

Tsuda H, Sakamaki C, Fukutomi T, Hirohashi S. Squamoid features and expression of involucrin in primary breast carcinoma associated with high histological grade, tumour cell necrosis and recurrence sites. **Br J Cancer** 1997; 75:1519-24.

Tsukamoto T. Establishment and characterization of a cell line (KU-8) from squamous cell carcinoma of the penis. **Keio J Med** 1989; 38:277-93.

van Hengel J, Gohon L, Bruyneel E, et al. Protein kinase C activation upregulates intercellular adhesion of alpha-catenin-negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes. **J Cell Biol** 1997; 137:1103-16.

Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, et al. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and *in situ* hybridization. **Hum Pathol** 1991; 22:908-13.

Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell–cell adhesion. **Cell** 2000;100:209-19.

Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, Degenstein L, Fuchs E. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. **Nat Cell Biol** 2001; 3:1076-85.

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

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

Velazquez EF, Cubilla AF. Penile squamous cell carcinoma. Anatomic, Pathologic and viral studies in Paraguay (1993-2007). **Anal Quant Cytol Histol** 2007; 29:185-198.

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.

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

Wajsman Z, Moure RH, Merrin CE, Murphy GP. Surgical treatment of penile carcinoma: a follow-up report. **Cancer** 1977; 40:1697-9.

Wallis S, Lloyd S, Wise I, Ireland G, Fleming TP, Garrod D. The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. **Mol Biol Cell** 2000; 11:1077-92.

Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer: Automated Cellular Imaging System (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. **Am J Clin Pathol** 2001; 116:495-503.

Wang L, Liu T, Wang Y, Cao L, Nishioka M, Aguirre RL, Ishikawa A, Geng L, Okada N. Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3, and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. **Virchows Arch** 2007; 451:959-66.

Weil M, Raff MC, Braga VM. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. **Curr Biol** 1999; 9:361-4.

Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. **J Biol Chem** 2001; 276:41175-81.

Welter JF, Crish JF, Agarwal C, Eckert RL. Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. **J Biol Chem** 1995; 270:12614-22.

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

White P, Aberle H, Vincent JP. Signaling and adhesion activities of mammalian beta-catenin and plakoglobin in Drosophila. **J Cell Biol** 1998; 140:183-95.

Whittock NV. Genomic sequence analysis of the mouse desmoglein cluster reveals evidence for six distinct genes: characterization of mouse DSG4, DSG5, and DSG6. **J Invest Dermatol** 2003; 120:970-80.

Whittock NV, Bower C. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. **J Invest Dermatol** 2003; 120:523-30.

Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. **J Cell Sci** 1998; 111:2477-86.

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.

Wiener JS, Walther PJ. The association of oncogenic human papillomaviruses with urologic malignancy. **Surg Oncol Clin North Am** 1995; 4:257-76.

Williams BO, Barish GD, Klymkowsky MW, Varmus HE. A comparative evaluation of beta-catenin and plakoglobin signaling activity. **Oncogene** 2000;19:5720-8.

Windoffer R, Borchert-Stuhltrager M, Leube RE. Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. **J Cell Sci** 2002;115:1717-32.

Winn RA, Bremnes RM, Bemis L, Franklin WA, Miller YE, Cool C, Heasley LE. Gamma-Catenin expression is reduced or absent in a subset of human lung cancers and re-expression inhibits transformed cell growth. **Oncogene** 2002; 21:7497-506.

Wu RL, Chen TT, Sun TT. Functional importance of an Sp1- and an NFkB-related nuclear protein in a keratinocyte-specific promoter of rabbit K3 keratin gene. **J Biol Chem** 1994; 269:28450-9.

Wu Y, Zhang X, Zehner ZE. c-Jun and the dominant-negative mutant, TAM67, induce vimentin gene expression by interacting with the activator Sp1. **Oncogene** 2003; 22:8891-901.

Yaffe MB, Beegen H, Eckert RL. Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. **J Biol Chem** 1992; 267:12233-8.

Yanagawa N, Osakabe M, Hayashi M, Tamura G, Motoyama T. Frequent epigenetic silencing of the FHIT gene in penile squamous cell carcinomas. **Virchows Arch** 2008; 452:377-82.

Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K. Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. **Eur J Cancer** 2006; 42:2397-403.

Yin T, Green KJ. Regulation of desmosome assembly and adhesion. **Semin Cell Dev Biol** 2004;15:665-77.

Young MD, Reda DJ, Walters WB. Penile carcinoma: a twenty-five years experience. **Urology** 1991; 38:529-32.

Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. **J Cell Sci** 2000a;113(Pt 18):3127-39.

Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. **Mol Cell Biol** 2000b; 20(12):4238-52.

ANEXOS

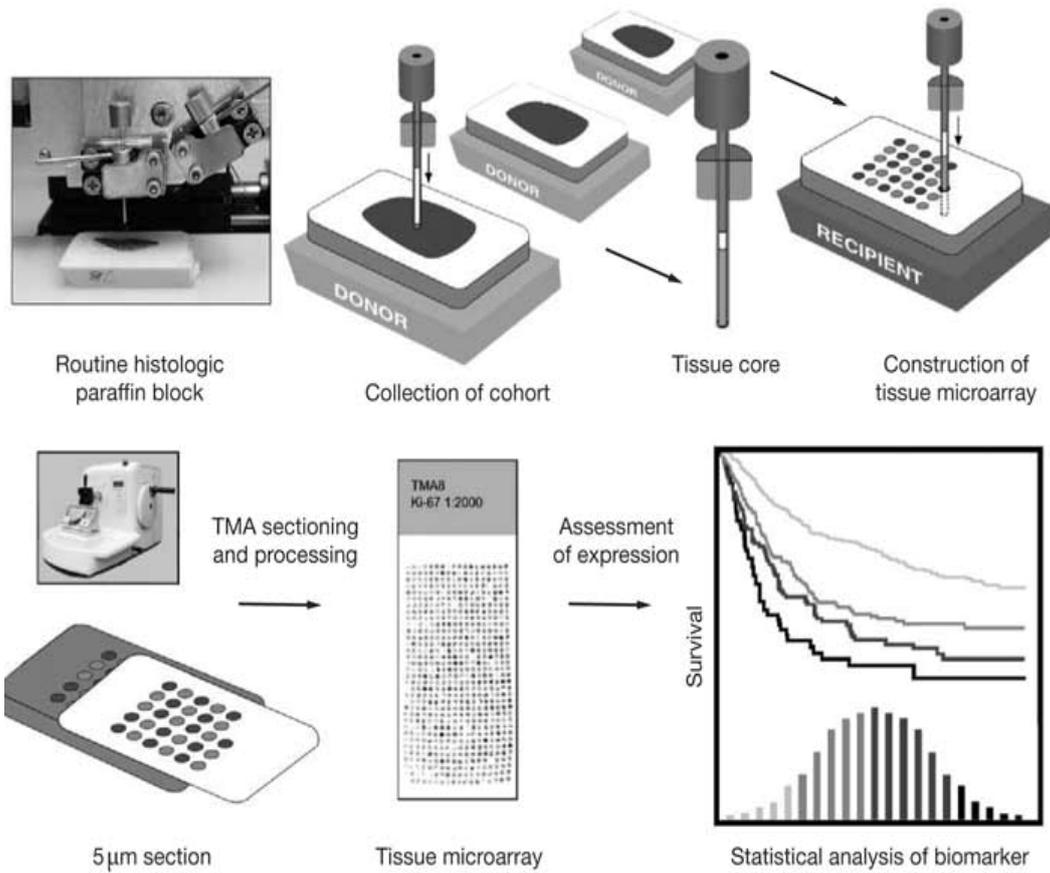
Anexo 1 - Ficha de levantamento de dados

**RISCO DE METASTASES LINFONODAL EM CANCER DE PÊNIS X
INVOLUCRINA, DESMOGLEINA, DESMOPLAKINA, PLAKOGLOBINA.**

01. N° do estudo - _____|_|_|_|_|
02. RG _____|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|
03. Data da Admissão __/__/__/__/__/__
04. Idade na Admissão (anos)_____|_|_|
05. Estado Civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) outros (9) Ign|_|
06. Raça: (1) Branca (2) Amarela (3) Negro (4) Ign|_|
07. Sinais / Sintomas: (1) Ferida (2) Dor (3) Inflamação (4) Disúria|_|
(5) Prurido (6) Outros (9) Ign.
08. Tempo de Evolução (meses) : _____|_|_|
09. Antecedentes venérios: (0) Não (1) Sim.|_|
10. Postectomia: (0) Não (1) Não relacionada (2)Relacionada (9) Ign|_|
11. Situação a 1ª consulta : (1) Biopsiado (2) Amputado (3) Esvaziado|_|
(4)Intacto (9) Ign.
12. Estadiamento cT: (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx|_|
13. Estadiamento cN: (0) N0 (1)N1 (2)N2 (3)N3 (4)N4 (9)Nx|_|
14. Estadiamento cM: (0) M0 (1)M1 (9)Mx|_|
15. Data da amputação/ ressecção __/__/__
16. Cirurgia: (0) Não (1) Amp. Parcial (2) Amp. Total (3) Exerese|_|
(4) Postectomia.
17. Tipo de esvaziamento ganglionar: (0) Não (1) Inguinal (2) Inguino-iliaco
.....|_| (9) Ign.
18. Intenção do esvaziamento: (1) Principio (2) necessidade (9) Ign|_|
19. Data do esvaziamento: __/__/__
20. Complicações relacionadas a amputação: (0) Não (1) Infecção.....|_|
(2) Deiscência (3) Estenose (4) hemorragia (9) Ign
21. Complicações relacionadas ao esvaziamento:|_|
(0)Não (1)Infecção (2) Deiscência (3) hematoma (4) necrose (5) linfedema
(6)Ruptura de vasos (9) Ign.
22. Número do AP : _____|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

23. Grau de Diferenciação: (1) Bem diferenciado (2) Mod. Diferenciado|_|
 (3) Pouco diferenciado (4) Não Classificado (9) Ign.
24. Espessura do tumor : (1) Até 1mm (2) 1-5mm (3) >5mm (9) Ign.|_|
25. Permeação linfática: (0) Não (1) Presente (9) Ign.|_|
26. Embolização venosa: (0) Não (1) Presente (9) Ign.|_|
27. Infiltração de corpos carvenosos: (0) Não (1) Presente (9) Ign.|_|
28. Infiltração da uretra : (0) Não (1) Presente (9) Ign.|_|
29. Infiltração de órgãos adjacentes: (0) Não (1) Presente (9) Ign.|_|
30. Alteração sugestiva de HPV (coilocitose): (1) Presente (2) Ausente (9) Ign.|_|
31. Total de Linfonodos examinados:|_|_|
32. Total de Linfonodos positivos:|_|_|
33. Lateralidade dos linfonodos positivos: (1) Unilat. (2) Bilateral (9) Ign.|_|
34. Cadeia linfonodal Positiva: (1) Inguinal (2) Inguinal + Ilíaco (3) Ilíaco (9) Ign.|_|
35. Data da recidiva: ___/___/___ ___/___/___
36. Local da recidiva: (0) Não (1) Coto (2) Regional (3) pulmões (4) Ossos|_|
 (5) Fígado (6) outros (9) Ign.
37. Tratamento da recorrência; (0) Não (1) RHD (2) Local (3) regional (4) Rxt|_|
 (5) Qt (6) outro (9) Ign.
38. Data do ultimo seguimento: ___/___/___
39. Situação no seguimento: (1) Vivo s/ doença (2) Vivo com doença|_|
 (3) Óbito por Cancer (4) Óbito por outra causa (5) perdido de vista

Anexo 2 - Construção do TMA



Giltane JM, Rimm DL. Construction and use of tissue microarrays for biomarker identification. *Nat Clin Practice Oncol* 2004; 1:104-11.

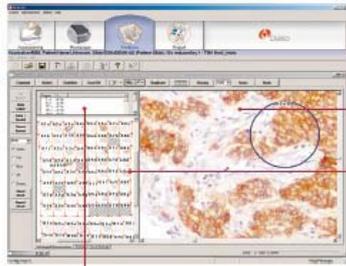
Anexo 3 – Acis III: Especificações do Produto



Specification	Dako ACIS®III Image Analysis System
Input Format	1 x 3 inch standard microscope slides
Objective Lens	Nikon 4X, 10X, 20X, 40X and 60X
Scanning Region	23 x 50 mm
Slide Loading	Automated, 100-slide loader maximum, using a 4-slide carrier
Tissue Finding	Automatic
Focus	Automatic
Network Interface	100/1000 Mbit/sec Ethernet
Dimensions	23" W x 18" H x 18" D (58 cm W x 46 cm H x 46 cm D)
Weight	125 lbs (57 kg)
Documentation	User's Manual
Warranty	12 months (parts & labor)
Service & Support	Included for 12 months
Regulatory Status	Class 2, CE-IVD

Software	
System Software	ACIS® version 3.0.1
Image Analysis Applications	Nuclear Application, Membrane Application and Rare Event Applications
Operating System	Microsoft Windows XP Professional
Additional Software	Microsoft Excel 2003
Additional Components	
Monitor	HP 23-inch Flat Panel Display
Report Printer	HP Color Printer
UPS	Uninterruptible Power Supply (110V or 220V)
Label Printer	Zebra Label Printer and label pack
Slide Scanning Speed	15 x 15mm, 10x objective (relative to 20V), 9 minutes

 For In Vitro Diagnostic Use.



Steps to Consistent Results

Step 1 Image Acquisition ACIS®III uses a proprietary *Silhouette Scanning* technique to locate core samples on the slide. This feature saves time and creates smaller files by scanning only areas where sample is present. Captured images are assembled as a histological reconstruction with low- and high-magnification images presented to the user for further analysis.

Step 2 Sample Selection User-defined templates are created easily to accommodate virtually any specimen layout, then the ACIS®III automatically creates a flexible mesh around each specimen within the array. If desired, the user manually can adjust the mesh to account for missing, touching or partial specimens within the array.

Step 3 Image Analysis With the touch of a button, ACIS®III automatically quantifies staining intensity, percent positive and other parameters for each core specimen. Numerical scores are presented to the reviewer for confirmation or further analysis. User has the option to score an entire specimen core or define analysis sub-regions within a core.

Step 4 Sample Navigation Specimens within the array are labeled clearly to facilitate navigation between the resulting data, and low magnification or high-magnification images.

Step 5 Data Management Analysis data from the tissue microarray are exported seamlessly into standard spreadsheet or database formats to dramatically simplify statistical or comparative analysis.

	A	B	C	D	E
1	Label	Brown Area	Blue Area	Percentage	Average Brown Intensity
2	A a 0	319	13502	2.31	63
3	A b 0	5017	6216	45.47	67
4	A c 0	793	13238	5.66	77
5	A d 0	2085	10189	16.99	61
6	A e 0	1833	9992	15.90	91
7	B a 0	551	16199	3.35	64
8	B b 0	5998	8362	41.77	104
9	B c 0	11189	3232	77.58	115
10	B d 0	4481	833	84.32	74
11	B e 0	956	2258	29.75	66
12	A a 1	995	22392	4.25	67
13	A b 1	331	14126	2.29	69