

**CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA  
REATIVIDADE IMUNOISTOQUÍMICA DOS  
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G PELA  
TÉCNICA DE “*TISSUE MICROARRAY*” NO  
CARCINOMA DE PÊNIS**

**JOSÉ FERNANDO DO PRADO MOURA**

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

**Área de concentração: Oncologia**

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

**Co-Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes**

**São Paulo**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Moura, José Fernando do Prado

**Correlação clínico-patológica da reatividade imunoistoquímica dos receptores acoplados a proteína G pela técnica de “*tissue microarray*” no carcinoma de pênis / José Fernando do Prado Moura – São Paulo, 2009.**

156p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DO PÊNIS. 2. IMUNOISTOQUÍMICA. 3. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS-G. 4. METÁSTASE LINFÁTICA.

## DEDICATÓRIA

### Dedico a conclusão desta tese...

A **Deus**, fonte de todo amor, de toda graça, de toda sabedoria e de toda ciência, sem o qual nada seria, nada poderia.

Aos meus pais, **Severino** e **Ângela**, que são exemplos vivos do amor de Deus para mim e que nunca mediram esforços para me educar.

Aos meus irmãos, **Luciano** e **Swhellem**, pelos quais eu tenho um grande amor e com os quais sempre posso contar.

A minha amada, **Gidineuda**, pelo incentivo, paciência e amor durante esse trabalho e toda nossa caminhada.

Ao **Hospital A. C. Camargo**, responsável pela minha formação profissional E por traduzir na prática aquilo que é pesquisado em laboratório.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, meu orientador, pela dedicação, estímulo e disponibilidade em todas as fases desta dissertação e que possibilitaram a sua conclusão. A este mestre que forneceu os princípios da curiosidade científica capaz de trazer ao laboratório questões ainda não resolvidas na prática clínica, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo, meu co-orientador, cuja dedicação e conhecimento ao estudo dessa neoplasia são exemplos seguidos por muitos de seus orientandos.

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo, pela ajuda na interpretação e análise dos dados estatísticos, pela amizade e disponibilidade que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos Drs. Marcelo Oliveira dos Santos e Olavo Feher, amigos e responsáveis por me ajudarem a traduzir para prática clínica os resultados obtidos na bancada do laboratório, pelo exemplo profissional e de vida.

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

A Sra. Suely Francisco, bibliotecária do Hospital AC Camargo, pela disponibilidade, competência e ajuda em todas as fases da elaboração deste trabalho.

A Sra. Ana Maria Kuninari e Luciana Pitombeira, competentes funcionárias da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, pelo cuidado e auxílio.

As Sras. Rosinéia Aguiar Carneiro, Francyne Polen Gomes de Lima e Srta. Maria Adriana Martins Bassoli, funcionárias da biblioteca do Hospital AC Camargo, pela constante ajuda e disponibilidade na obtenção dos artigos de minha revisão bibliográfica.

## RESUMO

Moura JFP. **Correlação clínico-patológica da reatividade imunoistoquímica dos receptores acoplados à proteína G pela técnica de “*Tissue Microarray*” no carcinoma de pênis.** São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** O tratamento de escolha do carcinoma invasivo de pênis é amputação e linfadenectomia radical. A presença de metástase para linfonodos é o fator prognóstico mais importante, mas a sua avaliação por métodos clínicos e laboratoriais é falha. Sem o tratamento os pacientes geralmente morrem nos dois primeiros anos por doença loco regional sem controle. O tratamento, no entanto, apresenta alta morbidade. **Objetivos:** O presente estudo se propõe a avaliar por imunoistoquímica os receptores acoplados à proteína G e sua associação com variáveis clínicas, demográficas, anátomo-patológicas, sobrevida câncer específica e sobrevida global em pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis. **População e Métodos:** Foram avaliados 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis submetidos à linfadenectomia radical ou aqueles pacientes com seguimento mínimo de 5 anos, sem linfadenectomia. **Resultados:** A média de seguimento foi de 98 meses. Estadiamento clínico T e N, invasão angiolinfática, invasão perineural, grau de diferenciação, invasão de uretra e invasão do corpo cavernoso estiveram associados significativamente com a presença de comprometimento linfonodal, na análise univariada. Os fatores independentes para comprometimento linfonodal foram estadiamento clínico N, invasão perineural e grau de diferenciação histológica tumoral. A imunoexpressão dos GPCRs esteve associada significativamente, na análise univariada, como segue: **PAR-1**, com estadiamento clínico N e sobrevida global; **GRPR**, com estadiamento clínico N, grau de diferenciação e invasão perineural; **EP2**, com invasão angiolinfática; **EP4**, com estadiamento clínico N; **CXCR4**, com grau de

diferenciação e invasão angiolímfática; marcação nuclear para **CXCR4** e **GPR54** com coilocitose. Na análise multivariada, os fatores adversos para sobrevida câncer específica foram estadiamento clínico N, invasão perineural, grau de diferenciação histológica e comprometimento linfonodal e para sobrevida global foram idade, estadiamento clínico N, invasão perineural, grau de diferenciação histológica, postectomia e comprometimento linfonodal. **Conclusão:** Estádio clínico N, invasão perineural e grau de diferenciação histológica tumoral foram fatores independentes para comprometimento linfonodal. Maior expressão para PAR-1 esteve associada com menor comprometimento clínico linfonodal e maior sobrevida global na análise univariada.

## SUMMARY

Moura JFP. **[Clinical-pathological correlation of immuno-histochemical reactivity of G-protein-coupled receptors in the penile carcinoma by the tissue microarray technique]**. São Paulo; 2009 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Introduction:** The treatment of choice for invasive penile carcinoma is amputation and radical lymphadenectomy. The presence of metastasis to lymph nodes is the most important prognostic factor, but its evaluation by clinical and laboratory methods is failure. The treatment, however, has high morbidity. Without treatment, patients usually die within the first two years, because of uncontrollable locoregional disease or rarely distant metastases.

**Objectives:** This study aims to assess by immunohistochemistry the G-protein-coupled receptors and its association with clinical, demographic, anatomical and pathological data, cancer specific survival and overall survival in patients with usual squamous cell carcinoma of the penis.

**Population and Methods:** We evaluated 248 patients with usual squamous cell carcinoma of the penis treated with resection of the primary tumor and lymphadenectomy or resection of the primary only in the patients followed at least 5 years without lymphadenectomy. **Results:** The average follow-up was 98 months, median was 64 months. Clinical staging T and N, angio-lymphatic embolization, perineural invasion, histological grade, invasion of urethra and invasion of corpora cavernosa were significantly associated with the presence of lymph node involvement in univariate analysis. The independent factors for lymph node involvement were clinical N stage, perineural invasion and histological grade of tumor differentiation. The immunoreactivity of GPCRs was significantly associated in univariate analysis, as follows: PAR-1 with clinical N stage and overall survival; GRPR, with clinical N stage, histological grade and perineural invasion; EP2 with angiolymphatic embolization; EP4, with clinical staging N; CXCR4, with histological grade

and angiolymphatic embolization; nuclear immunoreactivity for CXCR4 and GPR54 with koilocytosis. In multivariate analysis, the adverse factors for cancer specific survival were clinical N stage, perineural invasion, histological grade and lymph node involvement and for overall survival were age, clinical N stage, perineural invasion, histological grade, lymph node involvement and circumcision. **Conclusion:** N clinical stage, perineural invasion and histological grade of tumor differentiation were independent factors for lymph node involvement. Increased expression for PAR-1 was associated with lower clinical lymph node involvement and greater overall survival in univariate analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da trombina, PAR-1.....	59
<b>Figura 2</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da gastrina, GRPR.....	60
<b>Figura 3</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da prostaglandina E2, EP2.....	61
<b>Figura 4</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da prostaglandina E2, EP4.....	62
<b>Figura 5</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de quimiocina, CXCR4.....	63
<b>Figura 6</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de quimiocina, CXCR4 (marcação nuclear).....	63
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de kissipeptina, GPR54.....	64
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de kissipeptina, GPR54 (marcação nuclear.....	64
<b>Figura 9</b>	Curva de sobrevida câncer específica para os 248 pacientes portadores de câncer epidermóide usual do pênis.....	88
<b>Figura 10</b>	Curva de sobrevida global para 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual do pênis.....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Freqüência das variáveis clínicas, demográficas e cirúrgicas dos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual do pênis.....	40
<b>Tabela 2</b>	Tipo de cirurgia realizada entre os 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.....	41
<b>Tabela 3</b>	Intenção do esvaziamento linfonodal em 248 pacientes submetidos à linfadenectomia.....	42
<b>Tabela 4</b>	Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 248 pacientes portadores de Carcinoma epidermóide usual de pênis.....	42
<b>Tabela 5</b>	Número e porcentagem de linfonodos metastáticos nos 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.....	43
<b>Tabela 6</b>	Freqüência das variáveis anatomopatológicas em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.....	47
<b>Tabela 7</b>	Descrição dos anticorpos primários utilizados, controles positivos, diluições e fabricantes.....	51
<b>Tabela 8</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para PAR1, segundo variáveis clínico-demográfica nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	66
<b>Tabela 9</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para PAR1, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	67
<b>Tabela 10</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GRPR, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	68

<b>Tabela 11</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GRPR, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	69
<b>Tabela 12</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP2, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	70
<b>Tabela 13</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP2, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	71
<b>Tabela 14</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP4, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	72
<b>Tabela 15</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP4, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	73
<b>Tabela 16</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para CXCR4, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	74
<b>Tabela 17</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para CXCR4, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	75
<b>Tabela 18</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GPR54, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	76

<b>Tabela 19</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GPR54, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	77
<b>Tabela 20</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para CXCR4, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	78
<b>Tabela 21</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para CXCR4, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	79
<b>Tabela 22</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para GPR54, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	80
<b>Tabela 23</b>	Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para GPR54, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	81
<b>Tabela 24</b>	Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma epidermóide usual de pênis.....	82
<b>Tabela 25</b>	Status linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual do pênis.....	84
<b>Tabela 26</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para risco de metástase em linfonodos. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.....	86
<b>Tabela 27</b>	Situação clínica dos 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis, após atualização dos dados.	87
<b>Tabela 28</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual do pênis.....	89

<b>Tabela 29</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas de 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	90
<b>Tabela 30</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com imunorreatividade aos GPCRs em 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	91
<b>Tabela 31</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida câncer específica. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.....	92
<b>Tabela 32</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com as variáveis clínicas em 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.....	94
<b>Tabela 33</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.....	95
<b>Tabela 34</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com imunorreatividade aos GPCRs em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.....	96
<b>Tabela 35</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida global. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACIS</b>	<i>automated cellular image analysis system</i>
<b>AINES</b>	aini-inflamatórios não esteroidais
<b>APC</b>	<i>adenomatous poliposis coli</i>
<b>CEC</b>	Carcinoma espinocelular, carcinoma epidermóide
<b>Cn</b>	estadiamento clínico do comprometimento de linfonodos
<b>COX1</b>	cicloxigenase tipo 1
<b>COX2</b>	cicloxigenase tipo 2
<b>cT</b>	estadiamento clínico do tamanho tumoraL
<b>CXCR4</b>	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
<b>DNA</b>	<i>desoxiribonucleic acid</i>
<b>EGFR1</b>	<i>epidemal growth factor receptor 1</i>
<b>EP2</b>	<i>prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)</i>
<b>EP4</b>	<i>Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)</i>
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>GPCR</b>	receptor acoplado à proteína G
<b>GPR54</b>	<i>Kiss1 receptor (receptor da kissipeptina tipo 1)</i>
<b>GRP</b>	<i>gastrin releasing peptide</i>
<b>GRPR</b>	<i>Gastrin-releasing peptide receptor (receptor do peptídeo liberador de gastrina)</i>
<b>HIF 1•α</b>	Fator-1alfa induzido por hipoxia
<b>HPV</b>	<i>Human papillomavirus</i>

<b>LOH</b>	<i>loss of heterozigosis</i>
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MMP</b>	metaloproteinase
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAR1</b>	<i>Protease-activated receptor 1</i> (receptor da trombina)
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>RNA<sub>m</sub></b>	<i>ribonucleic acid messenger</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>reverse transcriptase-polimerase chain reaction</i>
<b>SDF1</b>	<i>stromal derivated factor 1</i>
<b>TMA</b>	<i>Tissue Microarray</i>
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VEGFR</b>	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1	O Carcinoma de Pênis no Mundo e no Brasil	4
2.2	Aspectos Morfológicos do Carcinoma de Pênis	10
2.3	O Estabelecimento do Prognóstico no Carcinoma de Pênis	13
2.4	Família dos Receptores Acoplados à Proteína G	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
5.1	Critérios de Inclusão e Exclusão	35
5.2	Caracterização da amostra	37
5.2.1	Dados demográficos, de antecedentes e de estadiamento	38
5.2.2	Aspectos cirúrgicos e da avaliação dos linfonodos	41
5.2.3	Revisão e avaliação morfológica	43
5.3	Confecção dos blocos de TMA	48
5.4	Técnica de imunoistoquímica	49
5.5	Interpretação das reações imunoistoquímicas	51
5.6	Análise estatística	54
<b>6</b>	<b>ANÁLISE DE RISCOS E ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
7.1	Aspectos imunoistoquímicos	58
7.2	Imunorreatividade dos GPCRS, variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas	65

7.2.1	PAR-1 e variáveis clínico-demográficas	65
7.2.2	PAR1 e variáveis anátomo-patológicas	66
7.2.3	GRPR e variáveis clínico-demográficas	67
7.2.4	GRPR e variáveis anátomo-patológicas	68
7.2.5	EP2 e variáveis clínico-demográficas	69
7.2.6	EP2 e variáveis anátomo-patológicas	70
7.2.7	EP4 e variáveis clínico-demográficas	71
7.2.8	EP4 e variáveis anátomo-patológicas	72
7.2.9	CXCR4 e variáveis clínico-demográficas	73
7.2.10	CXCR4 e variáveis anátomo-patológicas	74
7.2.11	GPR54 e variáveis clínico-demográficas	75
7.2.12	GPR54 e variáveis anátomo-patológicas	76
7.2.13	CXCR4 nuclear e variáveis clínico-demográficas	77
7.2.14	CXCR4 nuclear e variáveis anátomo-patológicas	78
7.2.15	GPR54 nuclear e variáveis clínico-demográficas	79
7.2.16	GPR54 nuclear e variáveis anátomo-patológicas	80
7.3	Avaliação do risco de metástases para os linfonodos	81
7.3.1	Análise Univariada	81
7.3.2	Análise Multivariada	85
7.4	Aspectos relacionados ao seguimento e à situação clínica dos pacientes	87
7.5	Análise de Sobrevida	88
7.5.1	Sobrevida Câncer Específica	88
7.5.2	Sobrevida Global	93
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>98</b>
8.1	Aspectos gerais	98
8.2	Imunoistoquímica dos receptores acoplados à proteína G	100
8.2.1	PAR1	102
8.2.2	GRPR	106
8.2.3	EP2 e EP4	110
8.2.4	CXCR4	116

8.2.5	GPR54	120
8.3	Aspectos relacionados à sobrevida	124
8.3.1	Sobrevida câncer específica	125
8.3.2	Sobrevida global	125
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>127</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>129</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Ficha de levantamento de dados

**Anexo 2** Sistema de Classificação do Tumor de Pênis – TNM, UICC, 2002.

**Anexo 3** Construção do TMA

**Anexo 4** Acis III: Especificações do Produto

**Anexo 5** Tabelas para as médias, medianas, desvios-padrão, valor mínimo e máximo e percentil para as intensidades e porcentagem da área marcada para os receptores acoplados à proteína G.

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma do pênis corresponde a mais de 95% das neoplasias malignas deste órgão. Estima-se que represente entre 0.4 e 0.6% das neoplasias malignas nos países desenvolvidos (GLOECKLER-RIES et al. 1990) e mais de 10% em alguns países da África e da América do Sul (RAJU et al. 1985).

Os linfonodos regionais são o sítio preferencial de disseminação metastática. As metástases por via hematogênica são raras e ocorrem entre 1 a 10% dos casos (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978). As metástases em linfonodos quando não tratadas tendem a ulcerar e se fixar ao feixe vasculo-nervoso. A morte destes pacientes, quando não tratados, acontece nos dois primeiros anos do diagnóstico devido a sepsis, hemorragias por ruptura dos grandes vasos e caquexia (BEGGS e SPRATT 1961; DERRICK et al. 1973).

A presença de linfonodos palpáveis ao diagnóstico pode variar de 20 a 96% (LOPES et al. 1996a). O único tratamento eficaz para as metástases em linfonodos é a linfadenectomia radical, que é acompanhada de alto índice de morbidade (30 a 86%) e de muitas críticas 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).

Várias formas de avaliação têm sido tentadas para diminuir a extensão ou evitar as linfadenectomias e suas conseqüências, como a biópsia do linfonodo sentinela descrita por CABANAS (1977), porém sem reprodutibilidade por outros autores (LOPES et al. 1996a).

Ultimamente a pesquisa do linfonodo sentinela utilizando-se linfocintilografia pré-operatória e o auxílio de um “gama-probe” no intra-operatório tem sido aventado como um método promissor na tentativa de diminuir o número de linfadenectomias 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%, deixando dúvidas sobre a eficiência do mesmo.

Por se constituir como o fator prognóstico mais importante e a sua avaliação não poder ser feita de forma confiável por exames de imagem ou clínico, faz-se imperativo o desenvolvimento de outros meios para se avaliar o risco do comprometimento de linfonodos e diminuir o número de linfadenectomias desnecessárias (LOPES et al. 1994).

Com este intuito, vários estudos utilizando fatores clínicos e anatomopatológicos do tumor primário e suas possíveis implicações no risco de metástases para os linfonodos têm sido desenvolvidos.

LOPES et al. (1996b), estudando estes fatores comprovaram a importância da presença de êmbolo tumoral linfático e vascular e a

espessura tumoral no risco de metástase para o linfonodo e conseqüentemente na sobrevida.

Recentemente muitos estudos têm empregado a avaliação de biomarcadores como potenciais fatores prognósticos em diferentes tipos de neoplasias.

Os receptores acoplados a proteína G (GPCR) são proteínas transmembrana que estão implicadas nos mecanismos de invasão e metástase de uma série de neoplasias (DORSAN et al. 2007). Vários estudos têm observado a presença da associação desses receptores e sua participação no crescimento, invasão, metástases e angiogênese em diversos tipos de tumores como o câncer de cabeça e pescoço (LUI et al. 2001; ONDREY et al. 1999; ALMOFTI et al. 2004; LANGO et al. 2002), câncer de mama (MULLER et al. 2001; THOMAS et al. 2005; BOIRE et al. 2005), dentre outros.

Desta forma, o estudo dos GPCR e sua correlação com parâmetros clínicos e patológicos do tumor primário na determinação do risco de metástase para linfonodos em pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis, pode ser importante na seleção dos reais candidatos para linfadenectomia e com isto evitar morbidades desnecessárias associadas ao procedimento.

Apesar de extensamente avaliados, estes biomarcadores não foram utilizados na avaliação prognóstica do carcinoma do pênis e podem desempenhar um papel importante neste tipo de neoplasia.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 O CARCINOMA DE PÊNIS NO MUNDO E NO BRASIL**

O câncer de pênis é uma doença rara em nações desenvolvidas e representa cerca de 0,5% de todas as neoplasias malignas (GLOECKLER-RIES et al. 1990). Nos Estados Unidos a incidência de 0,2/100.000 habitantes e permanece estável nos últimos 25 anos (WATERHOUSE et al. 1982).

Por outro lado, nos países em desenvolvimento, o câncer de pênis continua sendo um problema de saúde pública (PARKIN et al. 1997; MISRA et al. 2004). Em algumas regiões da África, Ásia e América do Sul chega a ser responsável por até 20% das neoplasias malignas no homem (RAJU et al. 1985). A maior incidência desta neoplasia encontra-se nas regiões de Barshi, Paranda e Bhum, na Índia (3,32/100000 habitantes) e os menores índices entre os judeus nascidos em Israel e EUA (0/100000 e 0,07/100000, respectivamente). Não parece haver distinção entre etnias negra e branca, quando se compara nível social semelhante (VATANASAPT et al. 1995).

O câncer de pênis corresponde a aproximadamente 2,1% de todos os tumores de homens brasileiros. A incidência é aumentada nas regiões norte-nordeste, onde estão as piores condições sócio-econômicas (BRUMINI 1982). É uma doença devastante emocional e fisicamente e de fácil diagnóstico precoce. Devido a sua distribuição geográfica há poucos

trabalhos científicos desenvolvidos no primeiro mundo e o conhecimento dos mecanismos moleculares do desenvolvimento do carcinoma de pênis é virtualmente desconhecido. Todas estas razões conferem a importância e necessidade de estudos nesta área.

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 está entre a 4<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> décadas de vida. Como fatores de risco principais estão a presença de fimose, más condições de higiene e baixo padrão socioeconômico (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; BRINTON et al. 1991). A circuncisão tem importante fator protetor para o desenvolvimento do carcinoma de pênis. Aspectos religiosos e culturais referentes à realização de postectomia na criança têm papel fundamental na incidência desta neoplasia, assim como a idade da realização da mesma (FREW et al. 1976; JOHNSON et al. 1973). Nos judeus postectomizados logo após o nascimento a incidência referida em alguns trabalhos é nula. Na Índia os mulçumanos que são operados entre os 3 e 12 anos de idade a freqüência é de 0,15%, enquanto, nos hindus não operados a freqüência chega a 3,1% (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; LOPES et al. 1993).

As populações com melhores níveis socioeconômicos e culturais onde higiene adequada é realizada, apresentam baixos índices desta neoplasia. Na Dinamarca que tem taxa de postectomia de apenas 1,6%, houve queda

na incidência do carcinoma de pênis de 1,15/100.000 homens para 0,82/100.000 homens. Este fato é atribuído à melhoria das condições de higiene, pois houve aumento de 35% para 90% entre 1940 e 1990 de habitações com acesso a água encanada (FRISCH et al. 1995).

A etiopatogenia do câncer de pênis ainda é pouco conhecida. A infecção pelo papilomavírus (HPV, do inglês *human papillomavirus*), o número de parceiros sexuais e a exposição ao tabaco estão entre os fatores que conferem 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). Os HPV-6 e -11 são os mais comumente associados a lesões não displásicas como verrugas genitais e podem ser encontrados 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 freqüentemente detectado na lesão primária e tem sido descrito nas lesões metastáticas (VARMA et al. 1991; IWASAWA et al. 1993).

A prevalência de HPV-DNA em parceiros sexuais de mulheres com infecção pelo HPV foi relatada em um estudo em 70% dos casos (NICOLAU et al. 2005).

A associação entre câncer de pênis e HPV é bastante variável na literatura onde alguns estudos têm observado incidência de até 80%, enquanto outros têm encontrado taxas que não passam dos 10% (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, entretanto, 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 HPV16 foi o mais prevalente (30,8%) seguido pelo HPV6 (6,7%) e HPV18 (6,6%) (BACKES et al. 2009). A presença do HPV, no entanto, não influencia o prognóstico do carcinoma de pênis, embora esse achado ainda seja controverso (LONT et al. 2006; SCHEINER et al. 2008).

O câncer de pênis geralmente inicia-se como uma lesão na glândula e quando não tratada estende-se para o prepúcio e o corpo, invade corpos cavernosos, uretra e mais tarde pode chegar à auto-amputação. Metástases para linfonodos da região femoral e ilíaca são vias de disseminação precoce no carcinoma peniano (NARAYANA et al. 1982; PERSKY e DIKERNION 1986; LOPES et al. 1994). As metástases por via hematogênica são incomuns e ocorrem em cerca de um a 10% (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978). Nos casos avançados, as complicações locais-regionais como infiltração de feixe vasculo-nervoso e, conseqüentemente, hemorragia

e septicemia são as principais causas de morte (PURAS et al. 1978; POMPEU 1993). As lesões pequenas, em estágio inicial, podem ser tratadas com ressecção convencional ou radioterapia e, excepcionalmente, microcirurgia realizada através da técnica micrográfica de Mohs ou laser (MOHS et al. 1992). Nos casos avançados a amputação parcial ou total ainda se faz necessária.

A presença de linfonodos palpáveis ao diagnóstico varia de 20 a 96% dos casos (SUFRIN e HUBEN 1987; HEGARTY et al. 2006). A avaliação clínica dos linfonodos não mostra grande acurácia na predição da presença de metástases. Cerca de 50% dos linfonodos inguinais clinicamente suspeitos para acometimento pelo tumor não apresentam comprometimento anatomopatológico. 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 de linfonodos da região inguino-ílfaca é parte importante da terapêutica, no entanto, 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). Devido a sua morbidade, a seleção dos pacientes que devem ser submetidos à linfadenectomia é hoje a questão mais importante no tratamento destas neoplasias.

As principais complicações são a necrose dos retalhos em 14 a 16%, a infecção de ferida operatória em 10% e o seroma e o linfedema de 19% a 50% (HERR 1992).

Diversos métodos foram testados como uma alternativa para melhorar a acurácia da avaliação dos linfonodos, que ainda persiste como um tema em discussão. 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; BURGERS et al. 1992; KROON et al. 2005b). Um estudo recente mostrou sensibilidade de 93% e especificidade de 91% em pacientes com linfonodomegalia clinicamente suspeita, entretanto com um número pequeno de casos (25 pacientes) (SAISORN et al. 2006).

A biópsia do linfonodo sentinela, descrita por CABANAS (1977), não se tornou método confiável, pelo alto índice de falso-negativo (PERINETTI et al. 1980; WESPER et al. 1986). A linfocintilografia descrita por HORENBLAS et al. (2000) com a utilização de gama-probe no intra-operatório, ainda não se mostrou confiável com índices de falso-negativos que varia de 16 a 20% (TANIS et al. 2002; KROON et al. 2004).

As indicações atuais para linfadenectomia, mesmo com linfonodos clinicamente negativos são: tumores em estágio T2, histologicamente pouco diferenciados e com invasão vascular. Nestes casos a incidência de linfonodos positivos é maior do que 50% (KROON et al. 2005a).

Mais recentemente o estudo de fatores bio-moleculares tem ampliado as ferramentas disponíveis para um melhor conhecimento da biologia deste tumor e uma avaliação mais acurada desses pacientes (LOPES et al. 2002, GUIMARÃES et al. 2006a; CAMPOS et al. 2006). Um melhor estadiamento pré-operatório permitirá um planejamento terapêutico mais adequado evitando a morbidade de cirurgias desnecessárias.

## **2.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CARCINOMA DE PÊNIS**

A grande maioria das neoplasias malignas do pênis é constituída por carcinomas, correspondendo a mais que 95% dos casos. Estes são derivados do epitélio pluriestratificado tanto da glândula como do sulco coronal e prepúcio. Os carcinomas epidermóides usuais constituem o grupo mais comum. Dados anatomopatológicos do tumor, tal como o grau de diferenciação, tem importância em relação à definição da probabilidade de envolvimento dos linfonodos (FRALEY et al. 1989; HORENBLAS et al. 1993), como também ao padrão de invasão tumoral (GUIMARÃES et al. 2006b).

Recentemente a OMS lançou a classificação histopatológica dos carcinomas penianos onde se destacam uma grande variedade de subtipos tais como os carcinomas basalóides, as variantes verrucosas (Warty, papilífero, cuniculatum), os carcinomas sarcomatóides e outras variantes raras (CUBILLA et al. 2001). Como esta classificação é ainda bastante

recente é necessário ainda validar a importância do reconhecimento destas variantes (GUIMARÃES et al. *in press*).

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. Comedonecrose é um achado frequente. Tendem a dar metástases para linfonodos e a taxa de mortalidade é alta (CUBILLA et al. 1998).

Os carcinomas condilomatosos, também chamados de tumores do tipo *Warty*, correspondem a 20% das neoplasias de aspecto verruciforme penianas. Acometem homens na quinta década de vida e crescem exofiticamente. Podem envolver tanto a glândula como o sulco coronal e o prepúcio. As células do tumor tendem a se agrupar em arranjos papilomatosos. Coilocitose é um achado comum e os núcleos são geralmente grandes, hipercromáticos e amassados. Há associação com HPV-16 e -6. O prognóstico é bom e apenas metastatizam aqueles tumores com invasões profundas (VELAZQUEZ e CUBILLA 2007).

Os carcinomas papilares acometem homens na quinta e sexta décadas. Crescem exofiticamente e possuem em média 3 cm. São tumores bem diferenciados, hiperkeratóticos que crescem em arranjos papilares. Não são associados ao HPV e raramente metastatizam para linfonodos (VELAZQUEZ e CUBILLA 2007).

Os carcinomas sarcomatóides geralmente aparecem como recidivas de CEC convencionais ou após radioterapia. São bastante infiltrativos estando os corpos cavernosos e esponjoso sempre comprometidos. São 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).

Há outras variantes de apresentação mais raras, mas com aparente importância clínica, como os carcinomas acantolíticos (CUNHA et al. 2009). Um quarto dos carcinomas penianos apresenta mais de um padrão sendo considerados carcinomas mistos. É sempre importante relatar os diversos padrões uma vez que, como podemos ver acima, apresentam comportamentos distintos.

O tamanho médio dos tumores penianos varia de três a quatro centímetros e macroscopicamente formam massas esbranquiçadas e irregulares. Basicamente encontramos três padrões de crescimento: superficial (crescimento horizontal), invasivo (crescimento vertical) e multicêntrico.

Os carcinomas penianos 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. 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. 2006b). 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 (VELAZQUEZ et al. 2008).

### **2.3 O ESTABELECIMENTO DO PROGNÓSTICO NO CARCINOMA DE PÊNIS**

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; NARAYANA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; KAMAT et al. 1993; POMPEU 1993; HORENBLAS et al. 1993, 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 (1984), 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.

Alguns estudos correlacionam a extensão do comprometimento dos linfonodos com o prognóstico. SRINIVAS et al. (1987) classificaram os pacientes com metástases em linfonodos em um linfonodo de N1, de dois a seis linfonodos de N2 e mais de seis 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%. Outros autores como 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 submetidos à linfadenectomia inguino-iliaco 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.

A correlação de informações clínicas e histológicas do tumor primário com a presença de metástases em linfonodos é outro aspecto que vem sendo analisado na literatura. 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 estágio clínico I (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. O mesmo autor, 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; ADEYOJU 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 tumores menores e maiores ou iguais a três centímetros, respectivamente. 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 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 (VELAZQUEZ et al. 2008).

Nos últimos anos, a avaliação de marcadores moleculares que possam estar relacionados com maior risco de metástase para linfonodos nesses pacientes tem aumentado, visto que uma associação importante desses marcadores com o prognóstico pode selecionar melhor os pacientes que se beneficiariam ou não da linfadenectomia.

A presença do DNA do HPV no tumor primário, 50% dos casos, não influencia significativamente a incidência de metástases para linfonodos nem a sobrevida (MCCANCE et al. 1986; VILLA e LOPES 1986; BEZERRA et al. 2001). 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 tem sido recentemente relacionada como fator independente para o risco de metástase para linfonodos (LOPES et al. 2002; MARTINS et al. 2002). LOPES et al. (2002) estudou a expressão de p53 e HPV DNA em 83 casos de carcinoma epidermóide de pênis e encontrou associação entre a imunexpressão do p53 e seus graus de positividade estiveram significativamente relacionados com estadios N, comprometimento linfonodal, embolização venosa e linfática. Pacientes negativos para p53 tiveram sobrevida global em cinco e dez anos 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), encontrou que quanto maior a positividade para p53, maior o risco de comprometimento dos linfonodos e pior a sobrevida.

Mais recentemente, moléculas de adesão e invasão têm sido avaliadas como marcadores prognósticos em espécies de carcinoma de pênis. CAMPOS et al. (2006), estudaram 125 casos de câncer de pênis e encontraram que a alta expressão de matriz de metaloproteinase 9 (MMP-9) foi considerada fator de risco independente para recorrência da doença, enquanto que a baixa expressão da E-Caderina esteve associada com maior risco de comprometimento linfonodal, na análise univariada. Ainda com referência às moléculas de adesão, as tetraespaninas são moléculas que medeiam a adesão célula-estroma. CD82 é um membro dessa família que foi recentemente estudado por PROTZEL et al. (2008). Eles avaliaram KAI1/CD82 por imunistoquímica em uma série de 30 casos de câncer peniano e encontraram que todos os pacientes com expressão baixa ou ausente de KAI1/CD82 tinham comprometimento linfonodal e que os pacientes com expressão positiva mostraram uma sobrevida significativamente melhor quando comparados com os outros grupos. Tal resultado também tem sido observado em outras neoplasias como câncer de mama e cabeça e pescoço (FARHADIEH et al. 2004; MALIK et al. 2009).

Os marcadores de proliferação celular PCNA, MIB-1/Ki67 foram avaliados em 125 casos de câncer de pênis por GUIMARÃES et al. (2007). Nessa série os autores não encontraram associação com variáveis clínicas e demográficas ou anátomo-patológicas, no entanto o MIB-1/Ki67 apresentou-

se como fator de risco independente para comprometimento metastático em linfonodos (GUIMARÃES et al. 2007). PROTZEL et al. (2007) avaliando a expressão de Ki67 e HPV DNA em 28 casos de câncer de pênis 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. SOUFIR et al. (2007) pesquisaram mutações e metilação em dois genes supressores de tumor associados com proliferação: o gene para quinase dependente de ciclina, CKDN2A e o p53 em neoplasia intra-epitelial vulvar, peniana e líquen escleroso como tentativas de estudar a carcinogênese dessas lesões. Eles encontraram uma alta frequência de mutações co-inativadoras dos genes para p53 e/ou CDKN2A, principalmente em tumores derivados de líquen escleroso, mas não nas lesões benignas, sugerindo um aperecimento tardio na patogênese dos carcinomas genitais, porém como havia apenas três casos de neoplasia peniana, tais conclusões devem ser feitas com cautela.

Outros marcadores moleculares têm sido investigados, porém com conclusões limitadas pelo pequeno número de casos estudados, o que difere das séries que estudaram p53 (LOPES et al. 2002), os marcadores de proliferação PCNA, e MIB-1/Ki67 (GUIMARÃES 2003) e MMP-9 (CAMPOS et al. 2006).

Ainda podemos citar artigos com casos isolados ou poucos casos avaliando anormalidades cromossômicas no carcinoma de pênis, sendo um

desses artigos com 26 casos (ALVES et al. 2001). Neste artigo, usando hibridação genômica comparativa, as alterações de números de cópias da seqüência do DNA foram semelhantes às aquelas observadas em outras neoplasias escamosas, tais como esôfago e cabeça e pescoço. 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.

POETSCH et al. (2007) analisou 62 repetições em regiões de microsatélite de 11 diferentes cromossomos em 28 carcinomas de pênis e 10 metástases desses casos, quanto aos desbalanços alélicos e à perda de heterozigose (LOH). Suas amostras incluíram também tipos não comuns como basalóide (4 casos), condilomatoso (1 caso), verrucoso (2 casos), sarcomatóide e papilar (1 caso de cada). A perda de heterozigose foi observada em mais de 25% dos tumores e foi encontrada em seis diferentes cromossomos (2q, 6p, 8q, 9p, 12q, 17p13). Nenhuma correlação foi observada entre perda alélica e evolução clínica para a maioria dos marcadores. Entretanto a LOH no cromossomo 6 (uma região de um gene supressor de metástases, NOL7, descrita em câncer de colo uterino) correlacionou-se com uma curta sobrevida, a mesma perda foi observada em vários outros tumores (POETSCH et al. 2007).

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 indentificar 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 expressão gênica (KROON et al. 2008).

Alterações epigenéticas também têm sido estudadas no carcinoma de pênis em poucos estudos. GUERRERO et al. (2008) estudou a hipermetilação do gene da trombospondina 1, RASSF1-A e p16, em 24 casos de carcinoma de pênis. Eles observaram 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 freqüências 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.

Atualmente 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.

## **2.4 FAMÍLIA DOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G**

Os receptores acoplados a proteína G (GPCR – do inglês G-protein coupled receptor) constituem uma família de proteínas da membrana celular com mais de 800 membros envolvidos na transdução de sinais externos à célula. Sua disfunção contribui para gênese de algumas das mais prevalentes doenças no homem, visto que esses receptores são alvos diretos ou indiretos de 50-60% dos agentes terapêuticos no mercado. (PIERCE et al. 2002).

Trata-se de uma proteína com sete domínios transmembrana que, quando ativado pelo seu ligante, dissocia a proteína G em suas subunidades acopladas ao receptor (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Tais subunidades vão ativar diversas vias de sinalização e seus efetores. A especificidade de cada receptor determina a natureza da via a ser sinalizada.

Há pouco tempo foi descoberta a participação desses receptores na progressão do câncer e metástase, o que tem despertado grande interesse na comunidade científica. Na verdade, as células neoplásicas podem usurpar dos mecanismos fisiológicos dos GPCR para proliferação autônoma, evasão da resposta imune, aumento de suprimentos de nutrientes e oxigênio, invasão de tecidos vizinhos e disseminação para outros órgãos

(DORSAN et al. 2007). A descoberta do gene **MAS**, que codifica um GPCR, em 1986, foi a prova da ligação direta entre a transformação celular e os GPCRs (YOUNG et al. 1986).

Muitos desses receptores têm sido estudados em diversos tipos de câncer (DORSAN et al. 2007) e demonstram a participação nos mecanismos de proliferação, sobrevivência, capacidade de invasão e metástase e atividade angiogênica das células neoplásicas. Podemos citar o estudo desses GPCR em câncer de cabeça e pescoço (LIU et al. 2001; ONDREY et al. 1999; ALMOFTI et al. 2004; LANGO et al. 2002) e de câncer de mama (MULLER et al. 2001; THOMAS et al. 2005; BOIRE et al. 2005), dentre outros.

Muitos deles estão superexpressos em vários tipos de câncer e contribuem para o crescimento tumoral quando estimulados por ligantes produzidos no local do tumor ou circulantes. Entre eles, os PARs (receptor de protease ativada, do inglês – *protease activated receptor*), receptores de citocinas e receptores de lipídios bioativos como o ácido lisofosfatídico (LPA) e esfingosina-1-fosfatase (S1P) estão implicados na proliferação celular desordenada em uma grande variedade de neoplasias.

A trombina exerce diversos efeitos que contribuem para a sobrevivência, invasão e metástase das células neoplásicas. O PAR-1 é um GPCR que é ativado pela trombina através da lise do grupamento N-terminal desse receptor (COUGHLIN 2000). Está superexpresso em câncer de mama invasivo (EVEN-RAM et al. 1998) e implicado em propriedades de crescimento e invasão de cânceres de cabeça e pescoço (LIU et al. 2001). A trombina também cliva o fibrinogênio, deixa uma matriz extra-celular rica em

fibrina e cria um ambiente favorável à adesão de células neoplásicas e endoteliais, o que proporciona o crescimento do tumor e de vasos. Dentre os efeitos proangiogênicos da trombina podemos destacar a expressão aumentada de VEGF (do inglês – vascular endothelial growth factor) pelas células neoplásicas e VEGFR nas células endoteliais (RICHARD et al. 2001; TSOPANOGLU e MARAGOUDAKIS 2004). Desta forma tem-se uma ligação entre a angiogênese e os GPCR.

A ativação parácrina e autócrina de GPCR estimulados por neuropeptídeos também é um evento freqüente em carcinomas humanos. Bradicinina, neuromedina B, colecistoquinina, peptídeo liberador de gastrina (GRP), angiotensina II e endotelina, ativam seus GPCR que estimulam a proliferação de vários tipos de células e têm um papel importante em muitos cânceres agressivos ao homem, como câncer de pulmão de pequenas células, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pâncreas e câncer de próstata (HEASLEY 2001; LANGO et al. 2002; DAAKA 2004; SZEPEHAZI et al. 2005).

É importante salientar que esses GPCR ativados por neuropeptídeos são acoplados a ativação da fosfolipase C e, desta forma, induzem elevação do cálcio intracelular e ativação da proteína quinase C (PKC). Isso pode ser ainda mais complexo uma vez que esses GPCR neuropeptídeos podem estimular a quinase reguladora de sinais extracelulares (ERK, do inglês – extracellular signal-regulated kinase) por vias convergentes e também Rho GTPases e todos os membros da superfamília das proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPK, do inglês – mitogen-activated protein kinase),

incluindo quinase do N-terminal do c-Jun (JNK), p38 e ERK5 (MARINISSEN e GUTKIND 2001).

Desta forma, a estimulação parácrina/autócrina destes receptores ativados por neuropeptídeos resulta na ativação de uma rede de sinalização, altamente interconectada e complexa, que acaba por regular a expressão de programas genéticos e promover a sobrevivência e proliferação desordenada das células neoplásicas. Por exemplo, o GRPR (do inglês – Gastrin-releasing peptide receptor), um GPCR ativado por neuropeptídeo, já foi identificado em neoplasias de cabeça e pescoço (LANGO et al. 2002), dentre outras.

De uma forma geral, a superexpressão de GPCR e sua ativação parácrina e autócrina, estimulada pela liberação de mediadores das células neoplásicas e do estroma, são os mecanismos mais frequentemente utilizados por estas células para estimular os GPCRs e suas vias de sinalização.

Os GPCRs são também alvos de mediadores inflamatórios revelando, desta forma, a possível ligação entre câncer e inflamação crônica.

As cicloxigenases 1 e 2 (**COX1** e **COX2**), formam prostaglandinas a partir da degradação do ácido araquidônico. As prostaglandinas são mediadores inflamatórios, cuja função é iniciada após a interação com seus receptores, dentre eles, os GPCRs. Sabe-se, atualmente, que o tratamento com anti-inflamatórios não-esteróidicos (AINES), que inibem a **COX1** e **COX2**, pode reduzir o risco e a incidência de muitos tipos de câncer (JÄNE e MAYER 2000). A presença de inflamação crônica tem recebido um papel

importante na gênese do câncer. Por exemplo, a inibição de **COX2** reduz o número e o tamanho de adenomas em portadores da mutação germinativa do gene da polipose adenomatosa coli (APC, do inglês – *adenomatous poliposis coli*) (BROWN e DUBOIS 2005). A inibição da **COX2** é uma interessante forma de prevenção em indivíduos saudáveis, embora considerações quanto a toxicidade mereçam ser feitas (GUPTA e DUBOIS 2001).

Entre as prostaglandinas, o papel da prostaglandina E2 (PGE2) e seus receptores GPCR, E1 a E4, tem sido evidenciado em estudos bem desenhados de modelo animal de câncer de cólon (HANSEN-PETRIK et al. 2002; HULL e KO 2004). A superexpressão de COX2 e a ativação de seus receptores GPCR, EP2 e EP4, pela PGE2 liberada pelas células estromais e do tumor, contribuem para o crescimento desordenado, angiogênese e potencial metastático de muitos outros tumores prevalentes que não os de cólon como, por exemplo, tumores de cabeça e pescoço, tumores não pequenas células de pulmão e tumores de mama (HIDA et al. 1998; LIN et al. 2002; CHANG et al. 2005).

A metástase é um dos maiores desafios no tratamento do câncer, pois causa diminuição da qualidade de vida e da sobrevida nos pacientes com câncer (CHAMBERS et al. 2002). A observância clínica tem mostrado que muitos cânceres têm preferência de enviar metástases para órgãos preferenciais, com incidência muito maior que a esperada para o padrão circulatório entre o tumor primitivo e seu sítio de metástase. De uma forma bastante frequente, essa metástase “órgão-específica” é causada pela

expressão aberrante de receptores de citocinas ligados a proteína G, pelas células do câncer, concomitante a maior liberação de citocinas pelo órgão secundário. As citocinas e seus receptores também dirigem a migração de leucócitos para os locais de inflamação e o tráfego de leucócitos e seus precursores entre a corrente sanguínea e os órgãos linfóides (BALKWILL 2004a).

As células neoplásicas expressam muitos receptores de citocinas que são liberadas para o microambiente do tumor pelas células do estroma, macrófagos, leucócitos e pelas próprias células tumorais, aumentando sua motilidade e sobrevivência de uma forma autócrina e parácrina (BALKWILL 2004b). Está claro que as células neoplásicas ganham vantagens com esses mecanismos e assim são selecionadas por sua capacidade de possuir atividade pro-migratória das citocinas e seus GPCR para metastatizar para órgãos regionais e distantes. Enquanto a maioria dos receptores pode ligar-se a diferentes citocinas, alguns são bastante seletivos, como o CXCR4, que se liga apenas ao fator 1 derivado da célula estromal (SDF1), também conhecido como CXCL12 (BALKWILL 2004b).

Muitos tipos de tumores expressam o CXCR4 de forma aberrante e, desta forma, desenvolvem vantagens proliferativas, de sobrevivência e pró-migratórias, enquanto os órgãos que frequentemente são sítios de metástases, incluindo linfonodos, medula óssea, pulmão e fígado, produzem o SDF1. Desta forma não é surpresa que os tumores com expressão aumentada de CXCR4 estejam associados com maior tendência metastática e pior prognóstico (BALKWILL 2004b).

A expressão do CXCR4 é muito maior nas células metastáticas que no tumor primário em neoplasias de pulmão, melanoma, neuroblastoma, neoplasia de cabeça e pescoço, colorretal, tireóide, próstata, rim, ovário e neoplasias hematológicas como leucemia aguda e mieloma múltiplo, por exemplo, (CHAMBERS et al. 2002; BALKWILL 2004b; BURGER et al. 2006).

Estudos em câncer renal têm evidenciado o porquê da ligação entre CXCR4 e metástase. Nessa neoplasia, existem mutações no gene VHL (von Hippel-Lindau), um gene supressor de tumor. Tal mutação está implicada em elevados níveis de HIF1 $\alpha$  (Fator-1 $\alpha$  induzido por hipóxia). O HIF1 $\alpha$  é um fator de transcrição que dirige a resposta tumoral devido à hipóxia (SEMENZA et al. 2003). Estudos mostrando que pacientes com mutação no gene VHL têm expressão aumentada de CXCR4 e pior prognóstico são um achado de que o CXCR4 é controlado pelo HIF1 $\alpha$  (STALLER et al. 2003).

A expressão do SDF1 é também regulada pelo HIF1 $\alpha$  (CERADINI et al. 2004). A ativação do HIF1 $\alpha$  em condições de hipóxia, frequentemente encontrada no microambiente do tumor, também estimula a expressão de CXCR4 em células neoplásicas. Resumindo, isto capacita as células neoplásicas para escapar de condições de baixo fluxo de oxigênio e migrar através de um gradiente de SDF1, que é liberado pela drenagem linfática e, assim, disseminar-se para outros órgãos que expressam o SDF1, explicando, desta forma, o uso da alça CXCR4-SDF1 como estratégia chave para metástase em muitos tumores sólidos (STALLER et al. 2003).

As vias de transdução de sinais dos GPCR são múltiplas e complexas. Elas resultam na produção de substâncias como as metaloproteinases

(MMP2 e MMP9) que degradam a matriz extra-celular e facilitam a invasão e metástase.

A maioria dos GPCRs terminam por ativar fatores de transcrição nuclear, principalmente o AP-1 (MARINISSEN e GUTKIND 2001).

O fator de transcrição AP-1 (ativador da proteína 1) é um complexo dimérico que compreende membros do JUN, FOS e ATF (ativador de fator de transcrição) e as famílias da proteína MAF (fibrossarcoma musculoponeurótico). Desta forma, o complexo AP-1 pode formar múltiplas combinações de heterodímeros e homodímeros, que irão determinar os genes que serão regulados pelo AP-1 (EFERL et al. 2003).

c-JUN é um regulador positivo da proliferação celular, uma vez que fibroblastos deficientes de c-JUN têm um defeito importante de proliferação *in vitro* (WISDOM et al. 1999) e a proliferação de hepatócitos deficientes de c-JUN está severamente prejudicada durante a regeneração hepática *in vivo* (BEHRENS et al. 2002).

A expressão de c-JUN já foi observada em uma variedade de tumores humanos, incluindo fígado (YUEN et al. 2001), câncer de pulmão não pequenas células (VOLM et al. 2002), neoplasias de endométrio (YOKOYAMA et al. 1998), cabeça e pescoço (RIVA et al. 1995; MIURA et al. 1997), pâncreas (FERRARA et al. 1999), mama (GEE et al. 2000) e cavidade oral (DE SOUSA et al. 2002). Somado a isso, altos níveis de expressão ou ativação de c-JUN é associada com pior prognóstico em neoplasias de pulmão não pequenas células (VOLM et al. 2002), mama (GEE et al. 2000), endométrio (YOKOYAMA et al. 1998), pâncreas

(FERRARA et al. 1999), e cavidade oral (RU-CHENG et al. 2005). Sabe-se que muitos genes alvos regulados pelo AP-1 são responsáveis por inibição de apoptose, angiogênese, invasividade e proliferação, processos estes que são requeridos para progressão tumoral e, conseqüentemente, metástase. Alguns estudos tem sugerido vias de ligação entre os GPCRs e AP-1, na tumorigênese (POST e BROWN 1996; PIERCE et al. 2001).

Vale salientar, também, que existem genes supressores tumorais que agem contrariamente aos mecanismos descritos acima. O gene supressor KiSS1 foi originalmente identificado pela sua expressão alterada em melanoma metastático, mas não naqueles com doença localizada (LEE et al. 1996). Além disso, a indução da expressão de KiSS1 em linhagens de células humanas de câncer de mama reduziu o potencial metastático quando avaliado em modelos de camundongos (LEE e WELCH 1997).

A proteína KiSS1 (também conhecida como metastina ou kissipeptina) é um decapeptídeo derivado do gene KiSS1 (BILBAN et al. 2004). Kissipeptinas ligam-se ao mesmo GPCR (KiSS1R: hOT7T175, AXOR12 e GPR54) (MUIR et al. 2001). Sabe-se, também, que a exposição de linhagens de células neoplásicas com expressão endógena ou programada de GPR54 à metastina diminui a expressão de metaloproteinase 9, motilidade e proliferação *in vitro* e previne metástases *in vivo* (LEE e WELCH 1997; KOTANI et al. 2001; YAN et al. 2001; HORI et al. 2001). Hipóteses levantadas a partir de estudos *in vitro* que mostram a supressão da motilidade e capacidade migratória de linhagens de células fetais bovinas sugerindo que a inibição de metástase poderia estar ligada a inibição de

mecanismos prometastáticos, particularmente a inibição do CXCR4. Um estudo encontrou que a ativação do GPR54 pela Kisspeptina regula negativamente a via de sinalização do CXCR4, inibindo seu programa de metástase (NAVENOT et al. 2005).

### 3 OBJETIVOS

Avaliar a imunoreatividade de receptores acoplados à proteína G (PAR-1, EP2, EP4, GRPR, CXCR4 e GPR54), através de imunoistoquímica, em blocos de “Tissue Microarray (TMA)” em carcinomas epidermóides usuais do pênis e correlacionar os resultados com variáveis clínico-patológicas mais importantes:

- a. frequência de metástases para linfonodos regionais;
- b. sobrevida câncer específica;
- c. sobrevida global

## 4 JUSTIFICATIVA

Pelo exposto até então fica claro que o carcinoma peniano é um problema de saúde pública em nosso país. O estudo deste tipo de neoplasia se reveste de grande importância, especialmente se considerarmos que a frequência dessa neoplasia no Brasil é muito maior do que nos países desenvolvidos. Este aspecto faz com que a literatura dos mecanismos moleculares do carcinoma peniano seja pouco entendida e faltem estudos de boa qualidade na área.

Como claramente exposto, a determinação de metástases para os linfonodos é o fator mais importante na determinação do prognóstico do câncer de pênis. Entretanto, a identificação clínica dos linfonodos comprometidos é difícil e está associada com altas taxas de falsos-positivos e falso-negativos. Considerando-se a intensa morbidade da linfadenectomia, é mandatório que estabeleçamos critérios mais adequados na predição dos casos de maior risco de metástases linfonodais. Hoje, os fatores associados a esta determinação, são meramente morfológicos e os estudos dos fatores moleculares é bastante escasso na literatura.

Os GPCR são fatores estudados em diversas neoplasias, mas ainda não foram explorados em carcinomas penianos. Considerando a sua participação em diversos mecanismos de biologia celular ligados ao câncer, somadas a ampla experiência de nosso grupo nestas neoplasias, este

trabalho pretende estudar a expressão imunoistoquímica de diversos GPCRs com os objetivos descritos previamente.

## 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo os pacientes admitidos na divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A. C. Camargo, no período de 1953 a 2005, com diagnóstico de carcinoma epidermóide usual (CEC) de pênis. Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários médicos arquivados no SAME – Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A. C. Camargo da Fundação Antonio Prudente de São Paulo.

Estes dados foram coletados a partir de uma ficha de levantamento de dados previamente definida (**Anexo 1**) e nela registrados, a partir daí foram realizadas análises retrospectivas de tais dados.

Foram selecionados pacientes que realizaram a cirurgia do tumor primário com ou sem linfadenectomia ínguino-ílfaca. Aqueles pacientes não submetidos à linfadenectomia tiveram um seguimento mínimo de cinco anos, tempo adequado para definir a ausência de metástase em linfonodos.

- ✓ Os critérios de inclusão foram:
  - a. Pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis, submetidos ao tratamento cirúrgico do tumor primário e à

linfadenectomia regional, uni ou bilateral em qualquer momento do seu seguimento.

- b. Pacientes com seguimento adequado por pelo menos 5 anos
  - c. Pacientes com material arquivado em bloco de parafina, suficiente para novos cortes histológicos e confirmação do diagnóstico.
- ✓ Os critérios de exclusão foram os seguintes:
- a. Pacientes que tenham segundo tumor primário;
  - b. Pacientes que realizaram tratamento adjuvante ou neo-adjuvante;
  - c. Pacientes com metástases à distância no momento do diagnóstico;
  - d. Outros tipos histológicos que não carcinoma epidermóide usual.
- ✓ Os critérios de avaliação do seguimento clínico
- Os pacientes foram classificados de acordo com o seguimento em:
- a. Vivos sem câncer, todos aqueles pacientes que se encontravam vivos, sem evidências clínicas, laboratoriais ou de exames de imagem de recorrência do tumor;
  - b. Vivos com câncer, todos aqueles pacientes com doença em atividade quando do último retorno;
  - c. Mortos pelo câncer ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até trinta dias após a cirurgia);
  - d. Mortos por outras causas, todos os pacientes cujo óbito pode ser claramente associado à outra causa que não atividade da doença neoplásica;

- e. Perdidos de seguimento, todos os pacientes que não compareceram ao seguimento regular com abandono por três consultas consecutivas.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A partir de um banco de dados com 937 casos, foram habilitados **384** casos de carcinoma peniano para análise, seleção de blocos de parafina, revisão de lâminas histológicas, com propósito de confirmação diagnóstica e construção do TMA. Os casos excluídos foram: 47 tratados exclusivamente com radioterapia, 40 tratados exclusivamente com quimioterapia, 37 pacientes que recusaram o tratamento, 38 sem dados acessíveis no prontuário, 47 com tratamento fora do Hospital A. C. Camargo, 170 casos com seguimento insuficiente, 115 casos sem material na blocoteca, 59 casos com tumores avançados. Dos 384 casos do TMA, 105 casos de histologias diferentes de carcinoma epidermóide usual (variantes sarcomatóide, *Warty*, verrucoso, etc) e 31 casos de tumores que foram perdidos durante a confecção do TMA.

Portanto, foram selecionados 248 casos de carcinoma epidermóide usual, que foram avaliados quanto aos dados clínicos, epidemiológicos, anátomo-patológicos e imunoistoquímicos, conforme **Anexo 1**.

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema **TNM, UICC 2002**, onde se recomenda o agrupamento de 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. A atual classificação TNM pode ser observada no **Anexo 2**.

### **5.2.1 Dados demográficos, de antecedentes e de estadiamento**

A idade dos pacientes variou de 21 a 87 anos, com mediana de 54 anos. Os pacientes foram categorizados quanto à sua idade em pacientes com até 60 anos e maiores de 60 anos, idade esta utilizada pelo Ministério da Saúde do Brasil e Organização Mundial de Saúde como definição para idoso em países em desenvolvimento. Um total de 165 (66,5%) pacientes tinham menos que 60 anos e 83 (33,5%), tinham mais que 60 anos.

A maioria dos pacientes era casada (73%) e da raça branca (74,6%), sem postectomia prévia (75,4%) e com seus tumores intactos à primeira consulta (66,1%). Dos 46 pacientes que fizeram postectomia, a maioria (33 pacientes) a fizeram em virtude do câncer. Com relação ao tempo de evolução da doença, este variou de 1 até 240 meses, sendo agrupado neste trabalho em menos de seis meses de evolução (46%), mais de seis meses de evolução (50,4%) e sem informação (3,6%).

Dos 248 pacientes, 153 souberam relatar antecedentes venéreos e destes, 89 (58,2%) não tinham antecedentes relacionados às doenças sexualmente transmissíveis.

De acordo com o sistema de estadiamento clínico TNM (2002), 28 pacientes (11,3%) apresentavam tumores T1; 115 pacientes (46,4%) apresentavam tumores T2; 93 pacientes (37,5%) apresentavam tumores T3;

12 pacientes (4,8%) apresentavam tumores T4. Em relação ao estágio N, foram encontrados 124 casos (50%), N0; 38 casos (15,3%), N1; 75 casos (30,2%), N2; 6 casos (2,4%), N3 e 5 casos (2%), Nx.

Estes dados estão resumidos na Tabela 1

**Tabela 1** - Frequência das variáveis clínicas, demográficas e cirúrgicas dos 248 pacientes portadores carcinoma epidermóide usual do pênis.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	%
<b>Idade</b>	Menor que 60 anos	165	66,5
	Maior que 60 anos	83	33,5
<b>Estado Civil</b>	Solteiro	15	6
	Casado	181	73
	Separado	2	0,8
	Outros	18	7,3
	Ignorado	32	12,9
<b>Raça</b>	Branco	185	74,6
	Não branco	63	25,4
<b>Tempo de evolução antes da primeira consulta</b>	Até 6 meses	114	46
	Mais que 6 meses	125	50,4
	**	9	3,6
<b>Antecedentes venéreos</b>	Não	89	35,9
	Sim	64	25,8
	**	95	38,3
<b>Postectomia</b>	Não	187	75,4
	Sim	46	18,5
	**	15	6
<b>Estadiamento cT*</b>	T1	28	11,3
	T2	115	46,4
	T3	93	37,5
	T4	12	4,8
<b>Estadiamento cN*</b>	N0	124	50
	N1	38	15,3
	N2	75	30,2
	N3	6	2,4
	Nx	5	2
<b>Situação do tumor na primeira consulta</b>	Biopsiado	72	29
	Amputado	9	3,6
	Intacto	164	66,1
	**	3	1,2

\* Estadiamento TNM (UICC 2002 – CID10, C67)

\*\* Casos sem informação

### 5.2.2 Aspectos cirúrgicos e da avaliação dos linfonodos

Com relação ao tipo de cirurgia realizado, 56,9% dos pacientes realizaram amputação parcial e 36% realizaram amputação total, sendo que procedimentos mais agressivos foram realizados em apenas seis (2,4%) pacientes, que foram submetidos à amputação interílio-abdominal (Tabela 2).

**Tabela 2** - Tipo de cirurgia realizada entre os 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

	Número de Pacientes	%
<b>Amputação Parcial</b>	141	56,9
<b>Amputação Total</b>	89	35,9
<b>Postectomia</b>	1	4
<b>Amputação Interílio-abdominal</b>	6	2,4
<b>Perdido</b>	11	4,4
<b>Total</b>	248	100

Ainda em relação aos procedimentos cirúrgicos, 116 pacientes foram submetidos a algum tipo de esvaziamento ganglionar tanto de forma profilática, esvaziamento de princípio (10,9%), quando o tumor apresentava características agressivas no exame anátomo-patológico; quanto de forma terapêutica, esvaziamento de necessidade (35,9%), quando as linfonodomegalias persistiam clinicamente positivas após curso de antibioticoterapia (Tabela 3).

**Tabela 3** - Intenção do esvaziamento linfonodal em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual do pênis.

Intenção do esvaziamento linfonodal	Número de Pacientes	%
Princípio	27	10,9
Necessidade	89	35,9
Não esvaziaram	132	53,2
<b>Total</b>	<b>248</b>	<b>100</b>

Em 40 (16,1%) pacientes foi realizado o esvaziamento inguinal e em 76 (30,6%) foi realizado o ínguido-íliaco. Um total de 132 (53,2%) pacientes não realizou nenhum tipo de esvaziamento ganglionar, sendo que estes têm um período mínimo de seguimento de três anos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 248 pacientes portadores de Carcinoma epidermóide usual de pênis.

Tipo de Esvaziamento	Número de Pacientes	%
Nenhum	132	53,2
Inguinal	40	16,1
Inguinal + Ilíaco	76	30,6
<b>Total</b>	<b>248</b>	<b>100</b>

Entre os 116 pacientes que foram submetidos à linfadenectomia, 55 (22,2%) não apresentavam nenhum linfonodo positivo ao exame anatomopatológico e 61 (24,6%) apresentaram ao menos um linfonodo positivo. Houve um total de 195 linfonodos acometidos pelo tumor, com uma variação de 1 a 21 linfonodos acometidos por paciente (Tabela 5).

**Tabela 5** – Número e porcentagem de linfonodos metastáticos nos 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

<b>Número de Pacientes</b> (%)	<b>Número de linfonodos metastáticos</b>
55 (22,2)	0
17(6,9)	1
17(6,9)	2
9(3,6)	3
6(2,4)	4
6(2,4)	5
3(1,2)	6
1(0,4)	9
1(0,4)	15
1(0,4)	21
132(53,2)	Não realizaram linfadenectomia
<b>Total 248 (100)</b>	<b>195</b>

De uma forma geral, 187 (75,4%) pacientes foram classificados como negativos para metástases linfonodais (clínica e patologicamente) enquanto 61 (24,6%) pacientes foram classificados como positivos.

### **5.2.3 Revisão e avaliação morfológica**

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

As lâminas dos respectivos pacientes foram separadas e aquelas de má qualidade, desprezadas, sendo feitas novas lâminas com o material parafinado, previamente coletado, para confirmação do diagnóstico e marcação da área tumoral. Três patologistas (Fernando Augusto Soares, Isabela Werneck Cunha e Antonio Cubilla), realizaram essa análise.

Os critérios usados para definição das variáveis anatomopatológicas foram:

1. 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. Sendo então agrupados em 1) até 5mm e 2) maior que 5mm.

2. Grau de diferenciação do tumor:

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

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

Grau III (pouco diferenciado): caracterizado pela raridade de células poligonais, com difícil visualização de pontes intercelulares.

Predomínio de células pequenas alongadas e indiferenciadas, acentuado pleomorfismo e hiperchromasia nuclear com mitoses numerosas e atípicas.

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

3. Embolização vascular venosa e linfática foram consideradas juntas, como invasão **angiolinfática**, assim caracterizadas:

✓ 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 hemáceas.

✓ Embolização vascular venosa:

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

4. Infiltração de corpo cavernoso e esponjoso:

Caracterizada por invasão de células neoplásicas dessa estrutura, vistas ao microscópio, parcial ou totalmente.

5. Infiltração uretral:

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

Foi observada uma predominância de tumores com graus intermediário (39,3%) e alto (42,7%). A maioria dos casos era de tumores sem invasão angiolinfática (66,1%), sem invasão perineural (60,5%).

Com relação à infiltração do corpo esponjoso e cavernoso, 71,8% tinham infiltração de corpo esponjoso enquanto 48,4% tinham infiltração do corpo cavernoso. A maioria dos casos não apresentava invasão de órgãos adjacentes (93,1%). A coilocitose foi utilizada como marcador para alterações celulares sugestivas da presença do papilomavírus humano (HPV) e estava presente em 52 pacientes (21%), ausente em 44 pacientes (17,7%) e sem informação em 152 pacientes (61,3%).

A Tabela 6 representa as características anatomopatológicas do tumor primário nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

**Tabela 6** - Frequência das variáveis anatomopatológicas em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	%
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	42	16,9
	Grau Intermediário	98	39,5
	Alto Grau	106	42,7
	*	2	0,8
Espessura do Tumor	Até 5mm	67	27
	Maior que 5mm	157	63,3
	*		9,7
Invasão Angiolinfática	Ausente	164	66,1
	Presente	62	25
	*	21	8,5
Invasão Perineural	Ausente	150	60,5
	Presente	78	31,4
	*	20	8,1
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	20	8,1
	Presente	178	71,8
	*	50	20,2
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	68	27,4
	Presente	120	48,4
	*	60	24,2
Infiltração de Uretra	Ausente	106	42,7
	Presente	65	26,2
	*	77	31
HPV (coilocitose)	Ausente	44	17,7
	Presente	52	21
	*	152	61,3
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	231	93,1
	Presente	4	1,6
	*	9	5,3

\*Casos sem informação

O material foi então utilizado para confecção do *Tissue Microarray* (TMA) e, posteriormente, para estudo imunoistoquímico com os anticorpos para receptores acoplados à proteína G (GRPR, GPR54, PAR1, CXCR4, EP2 e EP4).

### 5.3 CONFECÇÃO DOS BLOCOS DE TMA

Foram construídos quatro blocos pela técnica do TMA, perfazendo um total de **384 casos** que posteriormente foram submetidos ao estudo imunohistoquímico.

Cada TMA contém dois cilindros de tumor e, portanto, a amostragem foi feita em duplicata. O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado de *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA).

A área identificada no bloco de parafina do doador foi puncionada com agulha de um milímetro e os cilindros obtidos transferidos para o bloco receptor. Construiu-se um mapa, com identificação detalhada de cada cilindro, permitindo a localização exata de cada caso. Um caso foi definido com adequado, quando o corte resultante ocupou pelo menos 24% da área total do cilindro. Foram realizados cortes seqüenciais 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.

Os aspectos técnicos do TMA encontram-se no **Anexo 3**.

#### **5.4 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA**

As reações de imunistoquímica 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 7, 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 realizadas 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 7** - Descrição dos anticorpos primários utilizados, controles positivos, diluições e fabricantes.

<b>Anticorpos</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Controles positivos</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricantes</b>
<b>PAR-1</b>	IgG – policlonal Coelho	Próstata	<b>1:200</b>	GenWay Biotech, Inc. San Diego, CA Número de catálogo: 18-461-10170
<b>EP2</b>	IgG – polyclonal Coelho	Cólon	<b>1:400</b>	Abcam, Inc. Cambridge, MA Número de catálogo: ab13091
<b>EP4</b>	IgG – policlonal Coelho	Cólon	<b>1:800</b>	Gene Tex, Inc San Antonio, TX Número de catálogo: GTX71435
<b>GRPR</b>	IgG – policlonal Coelho	Pâncreas	<b>1:400</b>	Gene Tex, Inc. San Antonio, TX Número de catálogo: GTX13339
<b>CXCR4</b>	IgG – policlonal Coelho	Amígdala	<b>1:1600</b>	Gene Tex, Inc. San Antonio, TX Número de catálogo: GTX70529
<b>GPR54</b>	IgG – policlonal Coelho	Pâncreas	<b>1:400</b>	Gene Tex, Inc. San Antonio, TX Número de catálogo: GTX12698

## 5.6. 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 GRPR, GPR54, CXCR4, EP2, EP4 e PAR1 foi realizada, quantitativamente, por meio do Sistema Automatizado de Imagem Celular (ACIS III DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Especificações do aparelho e encontram-se nos **Anexo 4**.

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 ***citoplasma\_histo***, residente no sistema. Este programa faz análise da densidade óptica do componente citoplasmático. As proteínas CXCR4 e GPR54 apresentaram, além da marcação citoplasmática, marcação de núcleos de células tumorais e, no caso dessas proteínas, foi utilizado o programa computacional ***nuclear\_histo*** para avaliação das células com núcleos marcados e não marcados, com intuito de diferenciá-las. Foram quantificadas as intensidades das densidades ópticas dos diferentes anticorpos, identificados durante o corpo do texto com o nome do anticorpo acrescido das letras **INT** (intensidade) ou **PORC** (porcentagem marcada das áreas tumorais), por exemplo, CXCR4**INT** (intensidade para marcação de CXCR4) e CXCR4**PORC** (porcentagem da área marcada positivamente para CXCR4), respectivamente.

Os dados de imunistoquímica para os receptores acoplados à proteína G (GRPR, GPR54, CXCR4, EP2, EP4 e PAR1) foram avaliados quanto à **intensidade** obtida pelo programa ***cytoplamic\_histo*** ou ***nuclear\_histo*** do ACIS III, medida em densidade óptica, e também foram avaliados quanto à **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 identificada como PORC (porcentagem de marcação marrom).

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram registrados em uma ficha de levantamento padronizada (**Anexo 1**) e digitadas e arquivadas em um banco de dados. Para a análise estatística foi utilizado o *software for Windows Statistical Package for Social Science (SPSS)*, versão 13.0.

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

A mensuração das variáveis quantitativas foi através de médias e respectivos desvios-padrões. As associações das variáveis qualitativas com expressão dos receptores **PAR-1**, **EP2**, **EP4**, **GRPR**, **CXCR4**, **KISS1(GPR54)** e presença de metástase em linfonodos foram efetuadas com o teste do qui-quadrado bi-caudal; sempre que necessário, devido às freqüências esperadas inferiores ao valor cinco 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 em linfonodos 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.

A análise da sobrevida global e câncer específica foi realizada 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 foi utilizado o modelo de riscos proporcionais de COX (1972) calculando-se as razões de risco proporcional para óbito.

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida câncer específica e sobrevida global, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram 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  $p < 0.05$ .

## **6 ANÁLISE DE RISCOS 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 conseqüências 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.

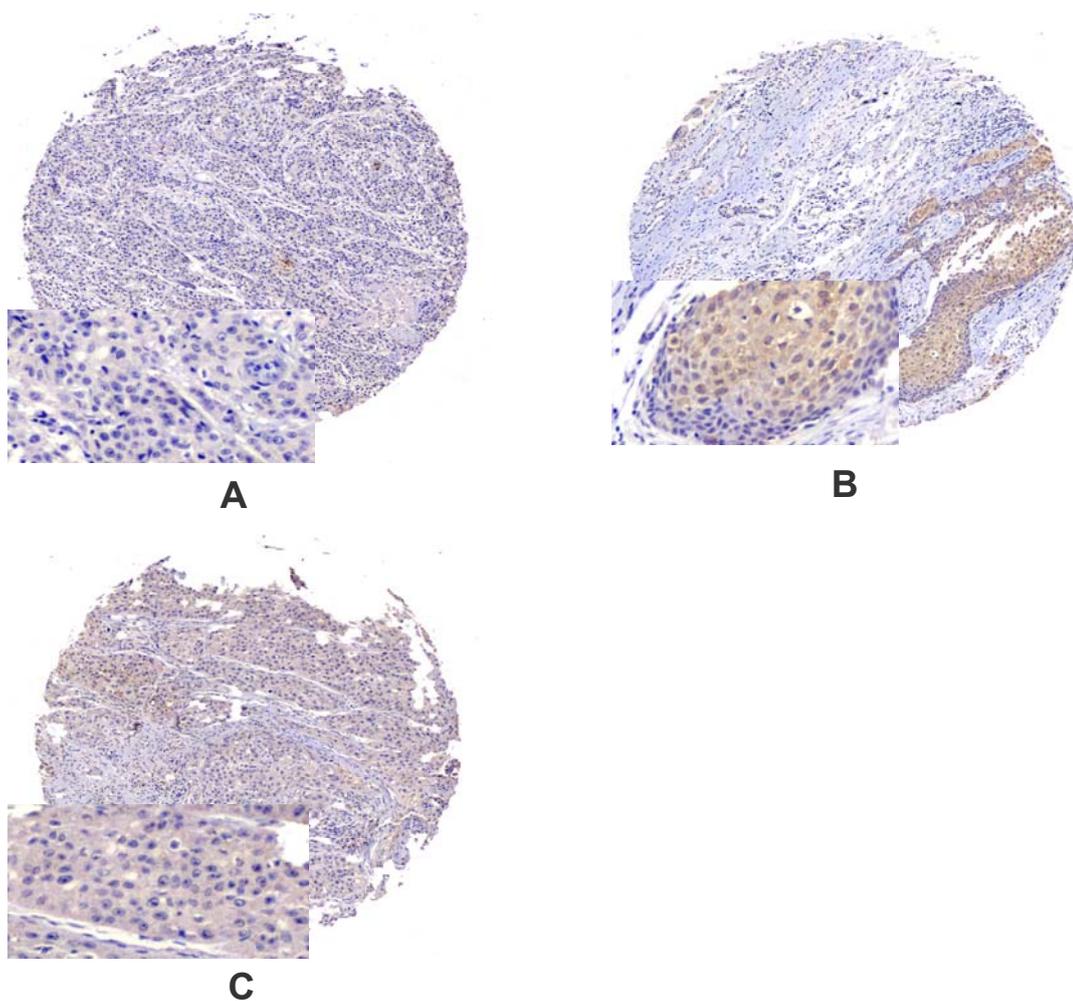
O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital AC Camargo e foi aprovado em 24/04/2007. Está protocolado sob o número 909/07.

## 7 RESULTADOS

### 7.3 ASPECTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

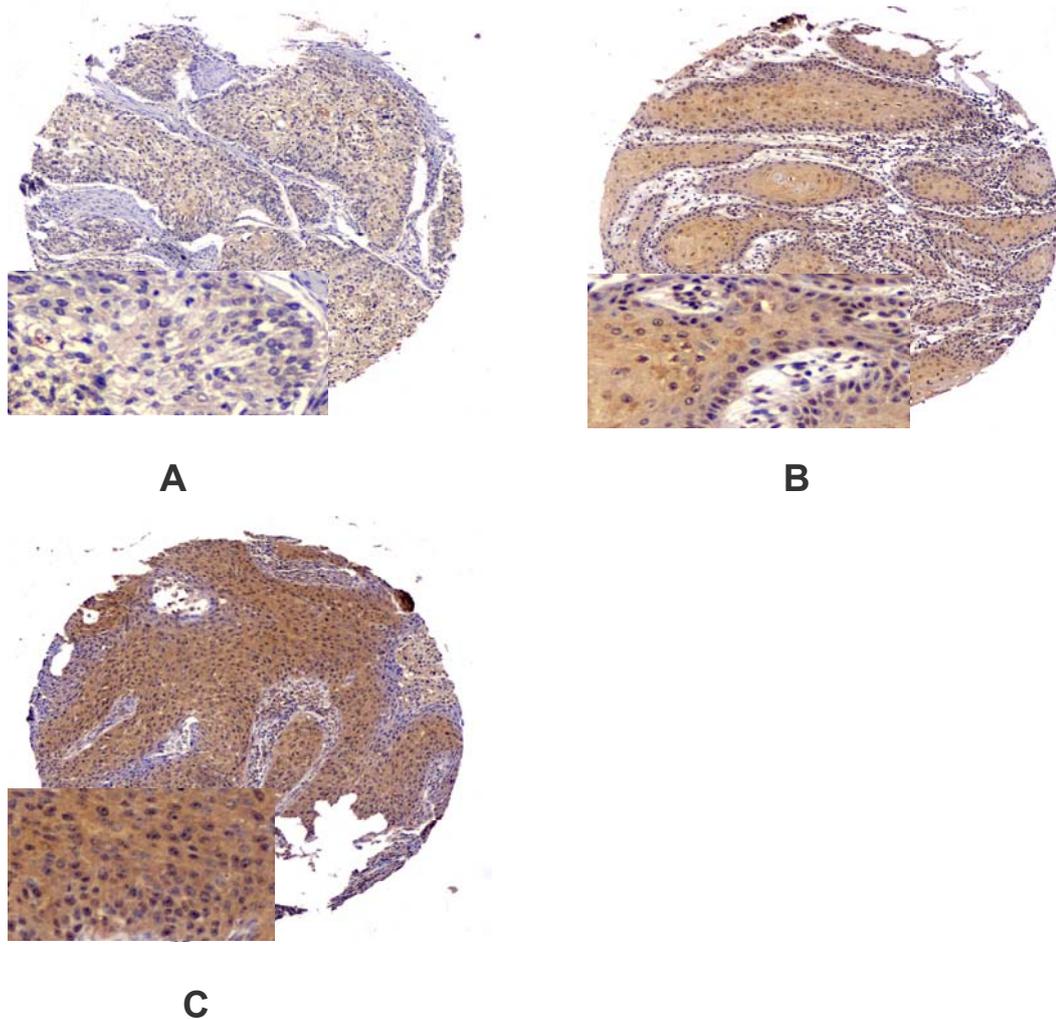
As médias, medianas, desvios-padrão, mínima, máxima e percentis para a intensidade e porcentagem de marcação para cada um dos seis receptores foram identificadas como mostrado no **Anexo 5** (Tabelas A, B e C).

Os resultados das reações imunoistoquímicas para os receptores acoplados à proteína G mostraram diferentes imunorreatividades, conforme observado nas figuras abaixo (Figuras 1 a 8).



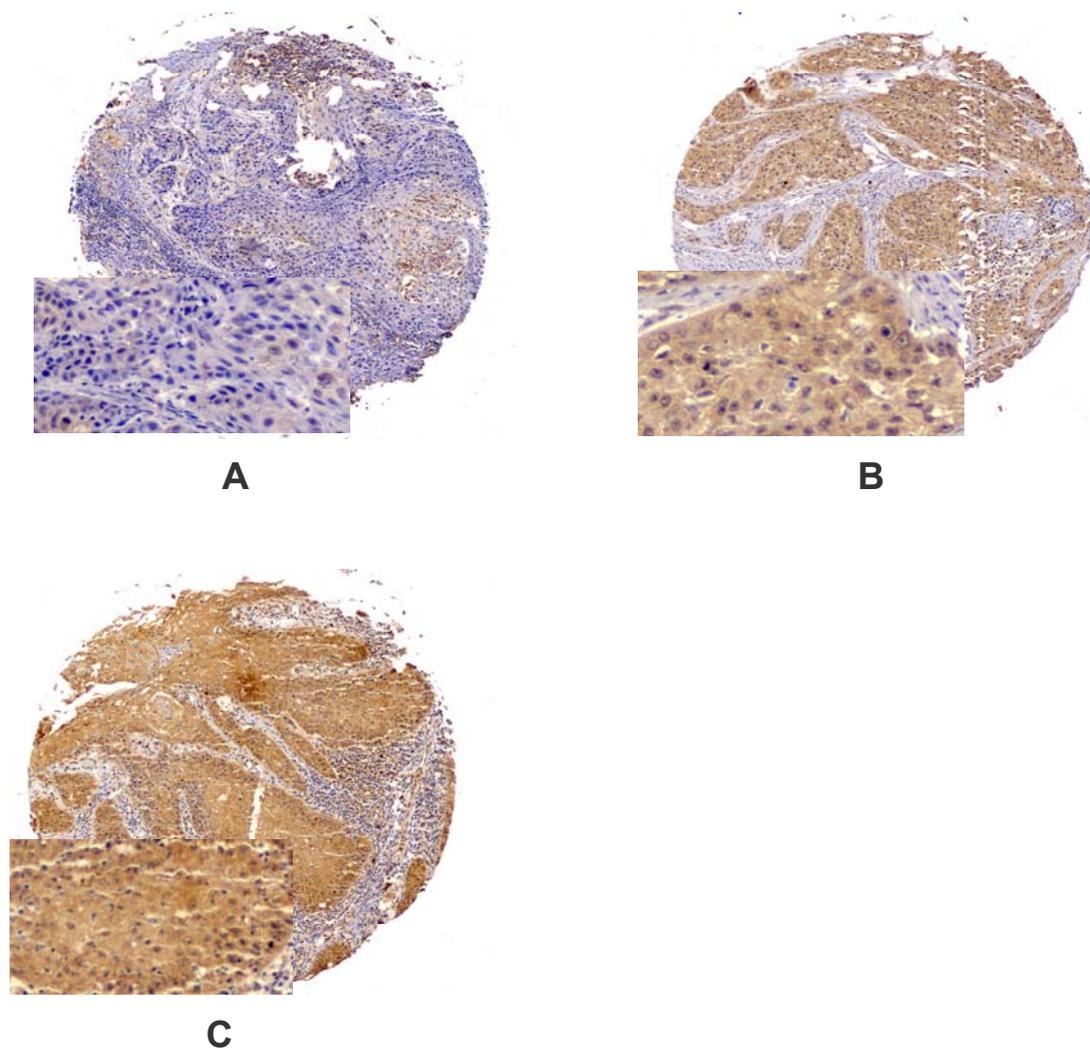
**Legenda:** Em **A** observamos um caso negativo (porcentagem de células marcadas menor que 5%) em **B** e **C** casos positivos (porcentagem de células marcadas > 5%). As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 1** – Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da trombina, PAR-1.



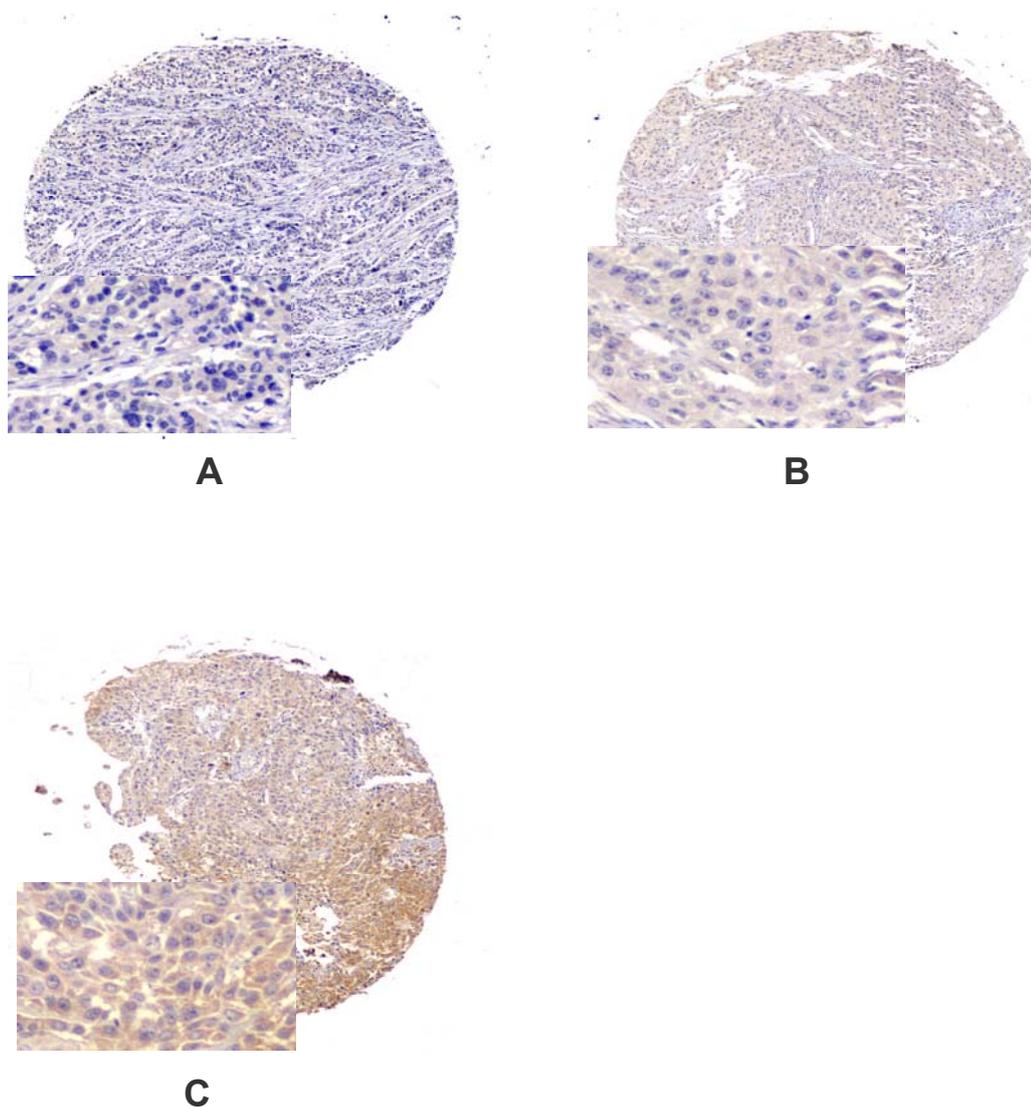
**Legenda:** Em **A** observamos um caso negativo (porcentagem de células marcadas menor que 75%) em **B** e **C** casos positivos (porcentagem de células marcadas >75%). As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 2** – Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da gastrina, GRPR.



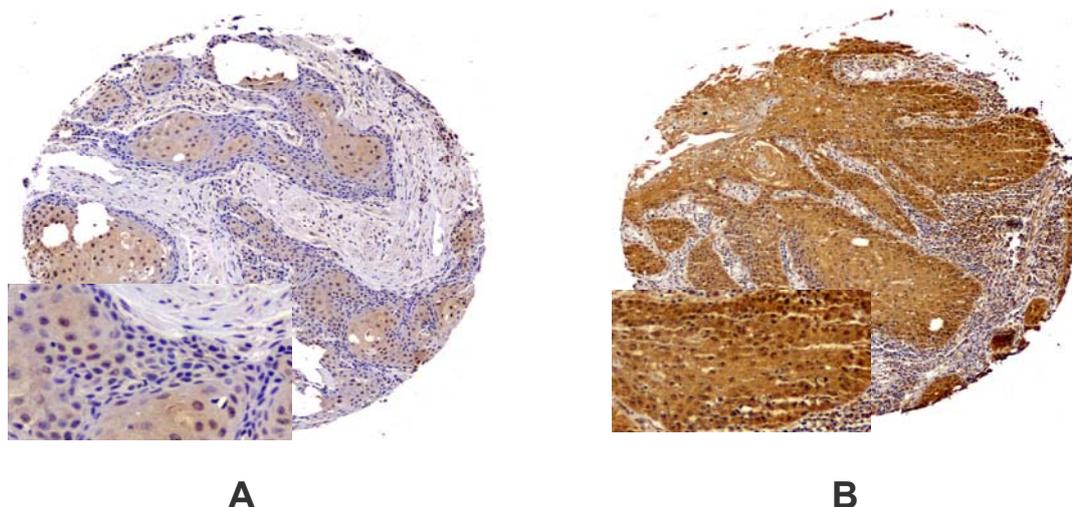
**Legenda:** Em **A** observamos um caso negativo (porcentagem de células marcadas menor que 30%) em **B** e **C** casos positivos (porcentagem de células marcadas >30%). As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 3** – Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da prostaglandina E2, EP2.



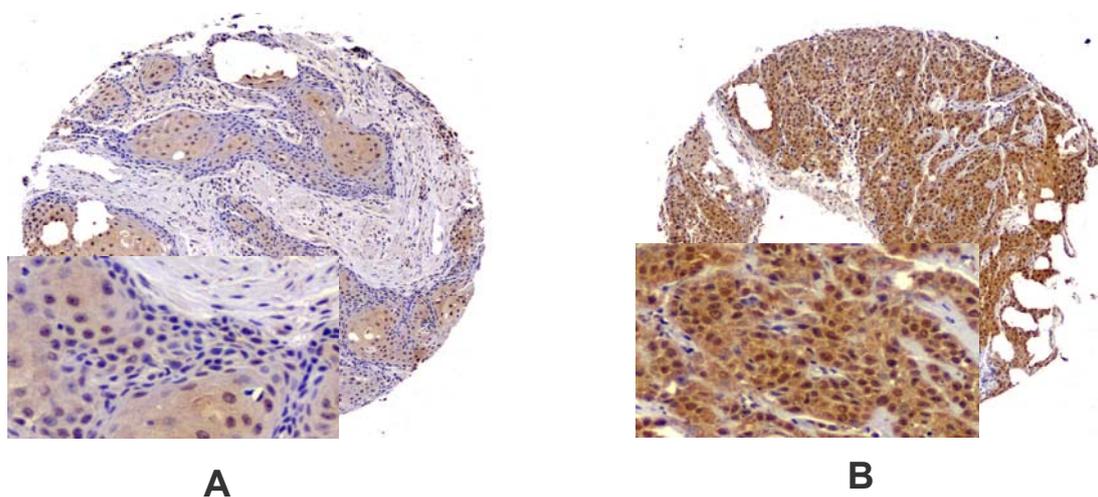
**Legenda:** Em **A** e **B** observamos casos negativos (porcentagem de células marcadas menor que 75%) e em **C**, caso positivo (porcentagem de células marcadas >75%). As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 4** – Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor da prostaglandina E2, EP4.



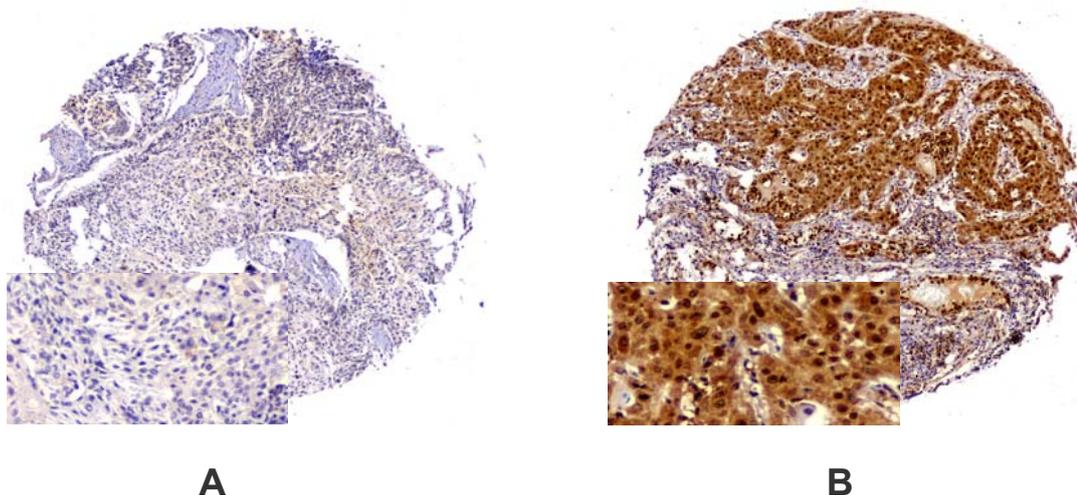
**Legenda:** Em **A** observamos um caso negativo (porcentagem de células marcadas menor que 75%) em **B** um caso positivo (porcentagem de células marcadas >75%). As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 5** – Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de quimiocina, CXCR4.



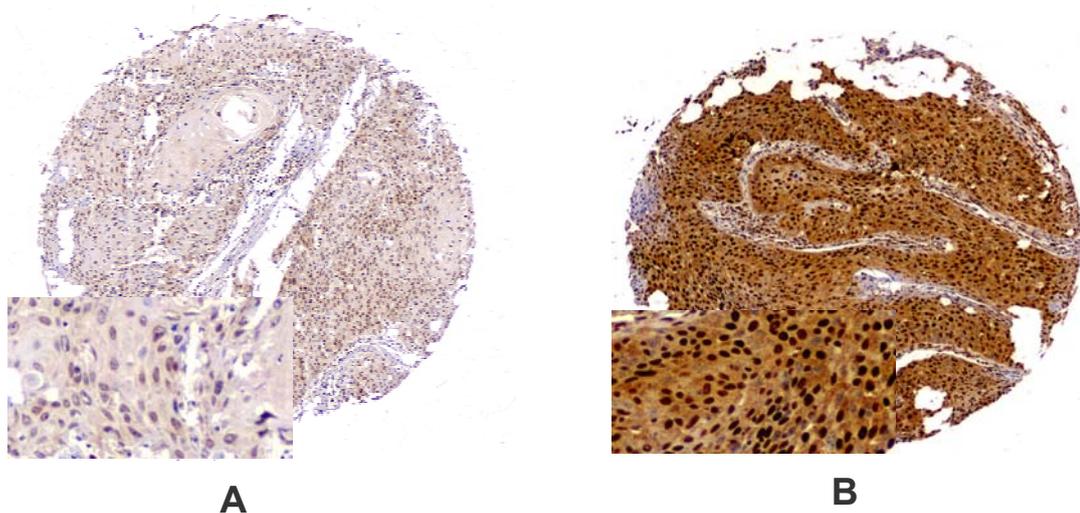
**Legenda:** Em **A** observamos um caso com marcação nuclear menor que 10% e em **B** maior que 10%. As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 6** – Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de quimiocina, CXCR4.



**Legenda:** Em **A** observamos um caso negativo (porcentagem de células marcadas menor que 75%) em **B** um caso positivo (porcentagem de células marcadas >75%). As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 7** - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de kissipeptina, GPR54.



**Legenda:** Em **A** observamos um caso com marcação nuclear menor que 10% d dm **B** maior que 10%. As intensidades de marcação são diferentes e não mostraram diferenças significativas. Aumento de 10x. Em detalhe, **zoom** de 75%.

**Figura 8** - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide usual de pênis com coloração imunoistoquímica para o receptor de kissipeptina, GPR54.

## **7.2 IMUNORREATIVIDADE DOS GPCRS, VARIÁVEIS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS E ANÁTOMOPATOLÓGICAS**

Foram realizadas análises estatísticas para porcentagem de áreas marcadas (reagentes ao GPCR) com a utilização de diferentes percentis, sendo considerado como referência aquele valor que esteve associado de forma significativa com um ou mais fatores clínicos e anátomo-patológicos ou conforme referências da literatura, quando disponível (Discussão dos Resultados).

### **7.2.1 PAR-1 e variáveis clínico-demográficas**

A **Tabela 8** mostra que o PAR1 foi associado significativamente apenas com o estágio clínico N ( $p=0,046$ ) e que não houve associação estatística com idade ( $p=0,364$ ), raça ( $p=0,287$ ), antecedentes venéreos ( $p=0,127$ ), postectomia ( $p=0,554$ ) ou estágio clínico T ( $p=0,658$ ).

**Tabela 8** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para PAR1, segundo variáveis clínico-demográfica nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	PAR1PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<5% N*(%)	>5% N*(%)	
<b>Idade</b>	Menor que 60 anos	18 (60)	136 (68,3)	0,364
	Maior que 60 anos	12 (40)	63 (31,7)	
<b>Raça</b>	Branco	25 (83,3)	148 (74,4)	0,287
	Não branco	5 (16,7)	51 (25,6)	
<b>Antecedentes venéreos</b>	Não	9 (42,9)	74 (60,7)	0,127
	Sim	12 (57,1)	48 (39,3)	
<b>Postectomia</b>	Não	33 (82,5)	137 (78,3)	0,554
	Sim	7 (17,5)	38 (21,7)	
<b>Estadiamento cT</b>	T1	2 (6,7)	26 (13,1)	0,658
	T2	14 (46,7)	93 (46,7)	
	T3	12 (40)	73 (36,7)	
	T4	2 (6,7)	7 (3,5)	
<b>Estadiamento cN</b>	Ausente	11 (36,7)	109 (56,2)	0,046
	Presente	19 (63,3)	85 (43,8)	

**Legenda:** PAR1PORC – porcentagem de área marcada para o PAR1, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.2 PAR1 e variáveis anátomo-patológicas

Houve associação significativa entre a marcação citoplasmática PAR1 e a invasão de órgãos adjacentes ( $p=0,047$ ), porém apenas 3 casos de invasão de órgãos foram observados; não houve associação estatística para grau de diferenciação ( $p=0,592$ ), invasão angiolinfática ( $p=0,217$ ), invasão perineural ( $p=0,203$ ), infiltração de corpo esponjoso ( $p=0,478$ ), infiltração de corpo cavernoso ( $p=0,230$ ), infiltração de uretra ( $p=0,249$ ) e coilocitose ( $p=0,501$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para PAR1, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	PAR1PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<5% N*(%)	>5% N*(%)	
<b>Grau de Diferenciação Estratificado</b>	Baixo grau (1)	4 (3,3)	34 (17,3)	0,592
	Alto grau (2 e 3)	26 (86,7)	163 (82,7)	
<b>Invasão Angiolinfática</b>	Ausente	19 (63,3)	135 (74,2)	0,217
	Presente	11 (36,7)	47 (25,8)	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	17 (56,7)	126 (68,5)	0,203
	Presente	13 (43,3)	58 (31,5)	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	1 (4)	18 (11,2)	0,478
	Presente	24 (96)	143 (88,8)	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	6 (26,1)	59 (39,1)	0,230
	Presente	17 (73,9)	92 (60,9)	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	10 (50)	90 (63,4)	0,249
	Presente	10 (50)	52 (36,6)	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	27 (93,1)	188 (99,5)	0,047
	Presente	2 (6,9)	1 (0,5)	
<b>Coilocitose</b>	Ausente	9 (50)	28 (41,2)	0,501
	Presente	9 (50)	40 (58,8)	

**Legenda:** PAR1PORC – porcentagem de área marcada para o PAR1, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.3 GRPR e variáveis clínico-demográficas

Dentre as variáveis clínico-demográficas, o estágio N esteve significativamente associado à área marcada com GRPR maior que 75% ( $p=0,021$ ). Não houve associação estatística para a variável idade ( $p=0,257$ ), raça ( $p=0,096$ ), antecedentes venéreos ( $p=0,133$ ), postectomia (0,765) e estágio clínico T ( $p=0,345$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GRPR, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	GRPRPORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75% N*(%)	>75% N*(%)	
<b>Idade</b>	Menor que 60 anos	128 (69,2)	31 (60,8)	0,257
	Maior que 60 anos	57 (30,8)	20 (39,2)	
<b>Raça</b>	Branco	135 (73)	43 (84,3)	0,096
	Não branco	59 (27)	8 (15,7)	
<b>Antecedentes venéreos</b>	Não	65 (56)	22 (71)	0,133
	Sim	51 (44)	9 (29)	
<b>Postectomia</b>	Não	138 (78,9)	38 (80,9)	0,765
	Sim	37 (21,1)	9 (19,1)	
<b>Estadiamento cT</b>	T1	23 (12,4)	4 (7,8)	0,345
	T2	83 (44,9)	27 (52,9)	
	T3	72 (38,9)	16 (31,4)	
	T4	7 (3,8)	4 (7,8)	
<b>Estadiamento cN</b>	Ausente	86 (47,5)	33 (66)	0,021
	Presente	95 (52,5)	17 (34)	

**Legenda:** GRPRPORC – porcentagem de área marcada para o GRPR, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

#### 7.2.4 GRPR e variáveis anátomo-patológicas

Houve associação significativa entre GRPR e grau de diferenciação tumoral (0,001), invasão perineural (p=0,030) e uma tendência para infiltração de uretra (p=0,066). Já as variáveis invasão angiolinfática (p=0,253), infiltração de corpo esponjoso (p=0,913) e de corpo cavernoso (p=0,555), invasão de órgãos adjacentes (p=1) e coilocitose (p=0,863) não estiveram associadas significativamente com a área marcada de GRPR >75% (Tabela 11).

**Tabela 11** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GRPR, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	GRPRPORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75%	>75%	
		N*(%)	N*(%)	
<b>Grau de Diferenciação</b>	Baixo Grau (1)	22 (12)	16 (32)	0,001
	Alto Grau (2 e 3)	162 (88)	34 (68)	
<b>Invasão Angiolinfática</b>	Ausente	119 (79,8)	38 (79,2)	0,253
	Presente	48 (29,2)	10 (20,8)	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	106 (62,4)	38 (79,2)	0,030
	Presente	64 (37,6)	10 (20,8)	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	16 (10,6)	4 (10)	0,913
	Presente	135 (89,4)	36 (90)	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	53 (37,6)	13 (32,5)	0,555
	Presente	88 (62,4)	27 (67,5)	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	84 (66,1)	20 (50)	0,066
	Presente	43 (33,9)	20 (50)	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	174 (98,3)	47 (100)	1
	Presente	3 (1,7)	0 (0)	
<b>Coilocitose</b>	Ausente	34 (43,6)	6 (46,2)	0,863
	Presente	44 (56,4)	7 (53,8)	

**Legenda:** GRPRPORC – porcentagem de área marcada para o GRPR, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.5 EP2 e variáveis clínico-demográficas

As variáveis clínico-demográficas não apresentaram associação significativa com a área marcação maior ou menor que 30% de EP2: idade (p=0,638), raça (p=0,769), antecedentes venéreos (p=0,767), postectomia (p=0,747), estágio clínico T (p=0,668) e N (p=0,911) (Tabela 12).

**Tabela 12** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP2, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	EP2PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<30% N*(%)	>30% N*(%)	
<b>Idade</b>	Menor que 60 anos	13 (72,2)	149 (66,8)	0,638
	Maior que 60 anos	5 (27,8)	74 (33,2)	
<b>Raça</b>	Branco	13 (72,2)	168 (75,3)	0,769
	Não branco	5 (27,8)	55 (24,7)	
<b>Antecedentes venéreos</b>	Não	6 (54,5)	81 (59,1)	0,767
	Sim	5 (45,5)	56 (40,9)	
<b>Postectomia</b>	Não	12 (75)	168 (80)	0,747
	Sim	4 (25)	42 (20)	
<b>Estadiamento cT</b>	T1	2 (11,1)	25 (11,2)	0,668
	T2	8 (44,4)	105 (47,1)	
	T3	6 (33,3)	83 (37,2)	
	T4	2 (11,1)	10 (4,5)	
<b>Estadiamento cN</b>	Ausente	9 (50)	112 (51,4)	0,911
	Presente	9 (50)	106 (48,6)	

**Legenda:** EP2PORC – porcentagem de área marcada para o EP2, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.6 EP2 e variáveis anátomo-patológicas

O EP2 esteve associado significativamente apenas com a invasão angiolinfática (p=0,033). Não houve associação estatística com grau de diferenciação (p=1), invasão perineural (p=0,586), infiltração de corpo esponjoso (p=0,080), infiltração de corpo cavernoso (p=0,259), infiltração de uretra (p=0,984), invasão de órgãos adjacentes (p=1) ou coilocitose (p=0,655) (Tabela 13).

**Tabela 13** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP2, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	EP2PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<30%	>30%	
		N*(%)	N*(%)	
<b>Grau de Diferenciação</b>	Baixo Grau (1)	3 (17,6)	37 (16,7)	1
	Alto Grau (2 e 3)	14 (82,4)	185 (83,3)	
<b>Invasão Angiolinfática</b>	Ausente	8 (50)	153 (74,6)	0,033
	Presente	8 (50)	52 (25,4)	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	12 (75)	135 (65,2)	0,586
	Presente	4 (25)	72 (34,8)	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	4 (23,5)	16 (9)	0,080
	Presente	13 (76,5)	162 (91)	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	7 (50)	59 (34,9)	0,259
	Presente	7 (50)	110 (65,1)	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	10 (62,5)	94 (62,3)	0,984
	Presente	6 (37,5)	57 (37,7)	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	17 (100)	207 (98,1)	1
	Presente	0 (0)	4 (1,9)	
<b>Coilocitose</b>	Ausente	3 (60)	39 (44,3)	0,655
	Presente	2 (40)	49 (55,7)	

**Legenda:** EP2PORC – porcentagem de área marcada para o EP2, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.7 EP4 e variáveis clínico-demográficas

A marcação para EP4 (área marcada maior ou menor que 75%, esteve significativamente associada ao estadiamento cN ( $p=0,047$ ). Não houve associação com idade ( $p=0,844$ ), raça ( $p=0,792$ ), antecedentes venéreos ( $p=0,991$ ), postectomia ( $p=0,462$ ) ou estadiamento clínico T ( $p=0,350$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP4, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	EP4PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75% N*(%)	>75% N*(%)	
<b>Idade</b>	Menor que 60 anos	86 (66,7)	76 (67,9)	0,844
	Maior que 60 anos	46 (33,3)	36 (32,1)	
<b>Raça</b>	Branco	96 (74,4)	85 (75,9)	0,792
	Não branco	33 (25,6)	27 (24,1)	
<b>Antecedentes venéreos</b>	Não	50 (58,8)	37 (58,7)	0,991
	Sim	35 (41,2)	26 (41,3)	
<b>Postectomia</b>	Não	97 (81,5)	83 (77,6)	0,462
	Sim	22 (18,5)	24 (22,4)	
<b>Estadiamento cT</b>	T1	12 (9,3)	15 (13,4)	0,350
	T2	59 (45,7)	54 (48,2)	
	T3	49 (38)	40 (35,7)	
	T4	9 (7)	3 (2,7)	
<b>Estadiamento cN</b>	Ausente	57 (45,2)	64 (58,2)	0,047
	Presente	69 (54,8)	46 (41,8)	

**Legenda:** EP4PORC – porcentagem de área marcada para o EP4, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.8 EP4 e variáveis anátomo-patológicas

A marcação para EP4 não apresentou associação significativa com grau de diferenciação (p=0,833), invasão angiolinfática (p=0,199), invasão perineural (p=0,683), infiltração de corpo esponjoso (p=0,609), infiltração de corpo cavernoso (p=0,659), infiltração de uretra (p=0,255), invasão de órgãos adjacentes (0,624) ou coilocitose (0,214) (Tabela 15).

**Tabela 15** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para EP4, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	EP4PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75%	>75%	
		N*(%)	N*(%)	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau (1)	21 (16,4)	19 (17,1)	0,883
	Alto Grau (2 e 3)	107 (83,6)	92 (82,9)	
Invasão Angiolinfática	Ausente	81 (69,2)	80 (76,9)	0,199
	Presente	36 (30,8)	24 (23,1)	
Invasão Perineural	Ausente	77 (64,7)	70 (67,3)	0,683
	Presente	42 (35,3)	34 (32,7)	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	10 (9,3)	10 (11,5)	0,609
	Presente	98 (90,7)	77 (88,5)	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	35 (34,7)	31 (37,8)	0,659
	Presente	66 (65,3)	51 (62,2)	
Infiltração de Uretra	Ausente	55 (58,5)	49 (67,1)	0,255
	Presente	39 (41,5)	24 (32,9)	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	117 (97,5)	3 (2,5)	0,624
	Presente	107 (99,1)	1 (0,9)	
Coilocitose	Ausente	26 (51)	16 (38,1)	0,214
	Presente	25 (49)	26 (61,9)	

**Legenda:** EP4PORC – porcentagem de área marcada para o EP4, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.9 CXCR4 e variáveis clínico-demográficas

Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre a marcação da área de CXCR4 (maior ou menor que 75%) com a idade (p=0,469), a raça (0,093), os antecedentes venéreos (0,374), a postectomia (p=0,325) ou os estádios clínicos T (p=0,733) e N (p=0,731) (Tabela 16).

**Tabela 16** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para CXCR4, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	CXCR4PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75% N*(%)	>75% N*(%)	
Idade	Menor que 60 anos	93 (64,6)	67 (69,1)	0,469
	Maior que 60 anos	51 (35,4)	30 (30,9)	
Raça	Branco	102 (70,8)	78 (80,4)	0,093
	Não branco	42 (29,2)	19 (19,6)	
Antecedentes venéreos	Não	54 (62,8)	35 (55,6)	0,374
	Sim	32 (37,2)	28 (44,4)	
Postectomia	Não	103 (77,4)	77 (82,8)	0,325
	Sim	30 (22,6)	16 (17,2)	
Estadiamento cT	T1	15 (10,4)	12 (12,4)	0,733
	T2	69 (47,9)	44 (45,4)	
	T3	55 (38,2)	35 (36,1)	
	T4	5 (3,5)	6 (6,2)	
Estadiamento cN	Ausente	71 (50,4)	50 (52,6)	0,731
	Presente	70 (49,6)	45 (47,4)	

**Legenda:** CXCR4PORC – porcentagem de área marcada para o CXCR4, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.10 CXCR4 e variáveis anátomo-patológicas

A marcação da área tumoral para CXCR4 (maior ou menor que 75%), associou-se significativamente ao grau de diferenciação (p=0,001) e à invasão angiolinfática (p=0,003). Uma associação significativa com invasão perineural (p=0,203), infiltração de corpo esponjoso (p=0,922), infiltração de corpo cavernoso (p=0,669), infiltração de uretra (0,349), invasão de órgãos adjacentes (p=0,564) ou coilocitose (p=0,622) não foi observada (Tabela 17).

**Tabela 17** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para CXCR4, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	CXCR4PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75%	>75%	
		N*(%)	N*(%)	
<b>Grau de Diferenciação</b>	Baixo Grau (1)	14 (9,9)	25 (25,8)	<b>0,001</b>
	Alto Grau (2 e 3)	128 (90,1)	72 (74,2)	
<b>Invasão Angiolinfática</b>	Ausente	85 (65,4)	75 (83,3)	<b>0,003</b>
	Presente	45 (34,6)	15 (16,7)	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	83 (62,9)	64 (71,1)	0,203
	Presente	49 (37,1)	26 (28,9)	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	12 (10,4)	8 (10)	0,922
	Presente	103 (89,6)	72 (90)	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	42 (37,8)	25 (34,7)	0,669
	Presente	69 (62,2)	47 (65,3)	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	66 (65,3)	39 (58,2)	0,349
	Presente	35 (34,7)	28 (41,8)	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	137 (99,3)	88 (97,8)	0,564
	Presente	1 (0,7)	2 (2,2)	
<b>Coilocitose</b>	Ausente	30 (46,9)	12 (41,4)	0,622
	Presente	34 (53,1)	17 (58,6)	

**Legenda:** CXCR4PORC – porcentagem de área marcada para o CXCR4, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.11 GPR54 e variáveis clínico-demográficas

Dentre as variáveis clínicas idade (p=0,085), raça (p=0,872), antecedentes venéreos (0,869), postectomia (p=0,920), estágio clínico T (p=0,836) e N (p=0,309), nenhuma esteve associada significativamente com a marcação para GPR54 (maior ou menor que 75%) (Tabela 18).

**Tabela 18** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GPR54, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	GPR54PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75% N*(%)	>75% N*(%)	
<b>Idade</b>	Menor que 60 anos	96 (63,2)	63 (74,1)	0,085
	Maior que 60 anos	56 (36,8)	22 (25,9)	
<b>Raça</b>	Branco	113 (74,3)	64 (75,3)	0,872
	Não branco	39 (25,7)	21 (24,7)	
<b>Antecedentes venéreos</b>	Não	51 (58)	35 (59,3)	0,869
	Sim	37 (42)	24 (40,7)	
<b>Postectomia</b>	Não	113 (79,6)	64 (79)	0,920
	Sim	29 (20,4)	17 (21)	
<b>Estadiamento cT</b>	T1	16 (10,5)	12 (14,1)	0,836
	T2	74 (48,7)	38 (44,7)	
	T3	56 (36,8)	31 (36,5)	
	T4	6 (3,9)	4 (4,7)	
<b>Estadiamento cN</b>	Ausente	74 (49,7)	47 (56,6)	0,309
	Presente	75 (50,3)	36 (43,3)	

**Legenda:** GPR54PORC – porcentagem de área marcada para o GPR54, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.12 GPR54 e variáveis anátomo-patológicas

Na análise da marcação para a proteína GPR54, houve uma tendência para associação com a invasão angiolinfática ( $p=0,065$ ), porém grau de diferenciação ( $p=0,933$ ), invasão perineural ( $p=0,320$ ), infiltração de corpo cavernoso ( $p=0,502$ ), infiltração de corpo esponjoso ( $p=0,432$ ), infiltração de uretra ( $p=0,738$ ), invasão de órgãos adjacentes ( $p=0,285$ ) e coilocistose ( $0,687$ ) não se associaram significativamente com a porcentagem da marcação para o GPR54 (Tabela 19).

**Tabela 19** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação citoplasmática para GPR54, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	GPR54PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<75%	>75%	
		N*(%)	N*(%)	
<b>Grau de Diferenciação</b>	Baixo Grau (1)	24 (15,9)	13 (15,5)	0,933
	Alto Grau (2 e 3)	127 (84,1)	71 (84,5)	
<b>Invasão Angiolinfática</b>	Ausente	107 (77)	51 (65,4)	0,065
	Presente	32 (23)	27 (34,6)	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	90 (64,3)	56 (70,9)	0,320
	Presente	50 (35,7)	23 (29,1)	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	11 (9,1)	9 (12,7)	0,432
	Presente	110 (90,9)	62 (87,3)	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	41 (38,7)	25 (33,8)	0,502
	Presente	65 (61,3)	49 (66,2)	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	61 (61,6)	43 (64,2)	0,738
	Presente	38 (38,4)	24 (35,8)	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	144 (99,3)	77 (97,5)	0,285
	Presente	1 (0,7)	2 (2,5)	
<b>Coilocitose</b>	Ausente	28 (45,9)	12 (41,4)	0,687
	Presente	33 (54,1)	17 (58,6)	

**Legenda:** GPR54PORC – porcentagem de área marcada para o GPR54, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.13 CXCR4 nuclear e variáveis clínico-demográficas

Houve significância estatística para associação entre a marcação nuclear para o CXCR4 com raça (p=0,006) e da postectomia (p=0,015), sendo que não foi encontrada associação com idade (p=0,927), antecedentes venéreos (p=0,342) e estádios clínicos T (p=0,531) e N (p=0,081) (Tabela 20).

**Tabela 20** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para CXCR4, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	CXCR4 nuclear PORC		p (x <sup>2</sup> )
		< 10% N*(%)	>10% N*(%)	
<b>Idade</b>	Menor que 60 anos	83 (66,9)	75 (66,4)	0,927
	Maior que 60 anos	41 (33,1)	38 (33,6)	
<b>Raça</b>	Branco	84 (67,7)	94 (83,2)	0,006
	Não branco	40 (32,3)	19 (16,8)	
<b>Antecedentes venéreos</b>	Não	39 (54,9)	47 (62,7)	0,342
	Sim	32 (45,1)	28 (37,3)	
<b>Postectomia</b>	Nenhuma	98 (86,7)	78 (71,6)	0,015
	Não relacionada ao câncer	3 (2,7)	19 (9,2)	
	Relacionada ao câncer	12 (10,6)	21 (19,3)	
<b>Estadiamento cT</b>	T1	14 (11,3)	13 (11,5)	0,531
	T2	54 (43,5)	57 (50,4)	
	T3	51 (41,1)	37 (32,7)	
	T4	5 (4)	6 (5,3)	
<b>Estadiamento cN</b>	Ausente	57 (46,3)	63 (57,8)	0,081
	Presente	66 (53,7)	46 (42,2)	

**Legenda:** CXCR4 nuclear PORC – porcentagem de marcação nuclear para o CXCR4, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.3.14 CXCR4 nuclear e variáveis anátomo-patológicas

A marcação nuclear para CXCR4 apresentou associação estatística apenas com a variável coilocitose (p=0,022) e não foi observada associação significativa com grau de diferenciação (p=0,454), invasão angiolinfática (p=0,452), invasão perineural (p=0,894), infiltração de corpo esponjoso (p=0,282), infiltração de cavernoso (p=0,910), infiltração de uretra (p=0,966) ou com invasão de órgãos adjacentes (p=0,093) (Tabela 21).

**Tabela 21** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para CXCR4, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	CXCR4 nuclear PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<10% N*(%)	>10% N*(%)	
<b>Grau de Diferenciação</b>	Baixo grau (1)	22 (17,9)	16 (14,3)	0,454
	Alto grau (2 e 3)	101 (82,1)	96 (85,7)	
<b>Invasão Angiolinfática</b>	Ausente	82 (70,7)	76 (75,2)	0,452
	Presente	34 (29,3)	25 (24,8)	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	77 (65,8)	68 (66,7)	0,894
	Presente	40 (34,2)	34 (33,3)	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	13 (12,6)	7 (7,9)	0,282
	Presente	90 (87,4)	82 (92,1)	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	33 (36,3)	33 (37,1)	0,910
	Presente	58 (63,7)	56 (62,9)	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	55 (62,5)	49 (62,8)	0,966
	Presente	33 (37,5)	29 (37,2)	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	122 (100)	99 (97,1)	0,093
	Presente	0 (0)	3 (2,9)	
<b>Coilocitose</b>	Ausente	28 (54,9)	12 (30,8)	0,022
	Presente	23 (45,1)	27 (69,2)	

**Legenda:** CXCR4 nuclear PORC – porcentagem de marcação nuclear para o CXCR4, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.15 GPR54 nuclear e variáveis clínico-demográficas

Houve uma tendência à associação significativa entre marcação nuclear para o GPR54 e presença de antecedentes venéreos ( $p=0,065$ ), no entanto não foi observada associação significativa com a idade ( $p=0,852$ ), a raça ( $p=0,511$ ), o tempo de evolução antes da primeira consulta ( $p=0,422$ ), a postectomia ( $p=0,685$ ), o estadiamento clínico T ( $p=0,907$ ) e o estadiamento clínico N ( $p=0,804$ ) (Tabela 22).

**Tabela 22** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para GPR54, segundo variáveis clínico-demográficas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	GPR54 nuclear PORC		p (x <sup>2</sup> )
		< 10% N*(%)	>10% N*(%)	
Idade	Menor que 60 anos	56 (68,3)	104 (67,1)	0,852
	Maior que 60 anos	26 (31,7)	51 (32,9)	
Raça	Branco	64 (78)	115 (74,2)	0,511
	Não branco	18 (22)	40 (25,8)	
Tempo de evolução antes da primeira consulta	Até 6 meses	41 (51,9)	69 (46,3)	0,422
	Mais que 6 meses	38 (48,1)	80 (53,7)	
Antecedentes venéreos	Não	25 (48,1)	60 (70,6)	0,065
	Sim	27 (51,9)	34 (36,2)	
Postectomia	Não	56 (77,8)	121 (80,1)	0,685
	Sim	16 (22,2)	30 (19,9)	
Estadiamento cT	T1	9 (11)	18 (11,6)	0,907
	T2	39 (47,6)	72 (46,5)	
	T3	30 (36,6)	59 (38,1)	
	T4	4 (4,9)	6 (3,9)	
Estadiamento cN	Ausente	40 (53,3)	81 (51,6)	0,804
	Presente	35 (46,7)	76 (48,4)	

**Legenda:** GPR54 nuclear PORC – porcentagem de marcação nuclear para o GPR54, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

### 7.2.16 GPR54 nuclear e variáveis anátomo-patológicas

A marcação nuclear para GRPR54 esteve associada significativamente à coilocitose (p=0,029). Por outro lado, não foi observada associação significativa com grau de diferenciação (p=0,870), invasão angiolinfática (p=0,801), invasão perineural (p=0,918), infiltração de corpo esponjoso (p=0,354), infiltração de cavernoso (p=0,387), infiltração de uretra (p=0,375) ou com invasão de órgãos adjacentes (p=0,555) (Tabela 23).

**Tabela 23** - Imunorreatividade da porcentagem de marcação nuclear para GPR54, segundo variáveis anatomopatológicas nos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	GPR54 nuclear PORC		p (x <sup>2</sup> )
		<10% N*(%)	>10% N*(%)	
Grau de Diferenciação	Baixo grau (1)	13 (16)	26 (16,9)	0,870
	Alto grau (2 e 3)	68 (84)	128 (81,3)	
Invasão Angiolinfática	Ausente	55 (74,3)	104 (72,7)	0,801
	Presente	19 (25,7)	39 (27,3)	
Invasão Perineural	Ausente	50 (66,7)	95 (66)	0,918
	Presente	25 (33,3)	49 (34)	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	9 (13,2)	11 (8,9)	0,354
	Presente	59 (86,8)	112 (91,1)	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	24 (41,4)	42 (34,7)	0,387
	Presente	34 (58,6)	69 (65,3)	
Infiltração de Uretra	Ausente	38 (66,7)	65 (59,6)	0,375
	Presente	19 (33,3)	44 (40,4)	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	81 (100)	141 (97,9)	0,555
	Presente	0 (0)	3 (1,3)	
Coilocitose	Ausente	20 (60,6)	21 (36,8)	0,029
	Presente	13 (39,4)	36 (63,2)	

**Legenda:** GPR54 nuclear PORC – porcentagem de marcação nuclear para o GPR54, obtida a partir do ACIS III; cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

## 7.3 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASES PARA OS LINFONODOS

### 7.3.1 Análise Univariada

Dentre as variáveis clínico-demográficas avaliadas o estadiamento clínico **T** (p=0,005) e o **N** (p=0,000) se associaram com a presença de metástase em linfonodos, enquanto idade (p=0,450), raça (p=0,398), tempo de evolução antes da primeira consulta (p=0,520), antecedentes venéreos

( $p=0,308$ ), postectomia ( $p=0,189$ ) e situação do tumor na primeira consulta ( $p=0,572$ ) não estiveram associadas significativamente (Tabela 24).

**Tabela 24** - Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	Linfonodo		p ( $\chi^2$ )
		Negativo N*(%)	Positivo N*(%)	
Idade	Menor que 60 anos	122 (65,2)	43 (70,5%)	0,450
	Maior que 60 anos	65 (34,8%)	18 (29,5%)	
Raça	Branco	137 (73,3)	48 (78,7)	0,398
	Não branco	50 (26,7)	13(21,3)	
Tempo de evolução antes da primeira consulta	Até 6 meses	88 (48,9)	26 (44,1)	0,520
	Mais que 6 meses	92 (51,1)	33 (55,9)	
Antecedentes venéreos	Não	63(55,8)	26 (65)	0,308
	Sim	50 (44,2)	14(35)	
Postectomia	Não	137 (78,3)	50 (86,2)	0,189
	Sim	38 (21,7)	8 (13,8)	
Estadiamento cT	T1	26 (13,9)	2 (3,3)	0,005
	T2	90 (48,1)	25 (41%)	
	T3	63 (33,7)	30 (49,2)	
	T4	8 (4,3)	4 (6,6)	
Estadiamento cN	N0	118 (63,1)	6 (9,8)	<0,001
	N1	22 (11,8)	16 (26,2)	
	N2	41 (21,9)	34 (55,7)	
	N3	2 (1,1)	4 (6,6)	
	Nx	4 (2,1)	1 (1,6)	
Situação do tumor na primeira consulta	Biopsiado	57 (31)	15 (24,6)	0,572
	Amputado	5 (2,7)	4 (6,6)	
	Intacto	122 (66,3)	42 (68,9)	

**Legenda:** cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

Dentre as variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas, as seguintes estiveram significativamente associadas com a presença de metástases linfonodais na análise univariada: grau de diferenciação ( $p=0,002$ ); invasão angiolinfática ( $p<0,001$ ); invasão perineural ( $p<0,001$ );

infiltração do corpo cavernoso ( $p=0,008$ ); infiltração de uretra ( $p= 0,002$ ) (Tabela 29). Espessura do tumor ( $p=0,103$ ), infiltração de corpo esponjoso ( $p=0,098$ ), invasão de órgãos adjacentes ( $p=0,147$ ), coilocitose ( $p=0,904$ ) e as medidas de imunorreatividade para PAR1 ( $p=0,200$ ), GRPR ( $p=0,083$ ), EP2 ( $p=0,779$ ), EP4 ( $p=0,792$ ), CXCR4 ( $p=0,727$ ), GPR54 ( $p=0,377$ ), CXCR4 nuclear ( $p=0,969$ ) e GPR54 nuclear ( $p=0,539$ ) não apresentaram associação significativa com a presença de metástases para linfonodos (Tabela 25).

**Tabela 25** - Status linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual do pênis.

Variável	Categoria	Linfonodo		p (x <sup>2</sup> )
		Negativo N(%)	Positivo N(%)	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	40 (21,6)	2 (3,3)	<b>0,002</b>
	Grau Intermediário	74 (40)	24 (39,3)	
	Alto Grau	71 (38,4)	35 (57,4)	
Espessura do Tumor	Até 5mm	54 (32,9)	13 (21,7)	0,103
	Maior que 5mm	110 (67,1)	47 (78,3)	
Invasão Angiolinfática	Ausente	131 (78,9)	33 (55)	<b>&lt;0,001</b>
	Presente	35 (21,1)	27 (45)	
Invasão Perineural	Ausente	132 (78)	18 (29,5)	<b>&lt;0,001</b>
	Presente	35 (21)	43 (70,5)	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	18 (12,2)	2 (4)	0,098
	Presente	130 (87,8)	48 (96)	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	57 (41,9)	11 (21,2)	<b>0,008</b>
	Presente	79 (58,1)	41 (78,8)	
Infiltração de Uretra	Ausente	88 (68,8)	18 (41,9)	<b>0,002</b>
	Presente	40 (31,3)	25 (58,1)	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	172 (92)	59 (96,7)	0,147
	Presente	3 (1,6)	1 (1,6)	
	*	12 (6,4)	1 (1,6)	
Coilocitose	Ausente	24 (45,3)	20 (46,5)	0,904
	Presente	29 (54,7)	23 (53,5)	
PAR1PORC	<5%	20 (11,5)	10 (18,2)	0,200
	>5%	154 (88,5)	45 (81,8)	
EP2PORC	<30%	13 (7,2)	5 (8,3)	0,779
	>30%	168 (92,8)	55 (91,7)	
EP4PORC	<75%	96 (53)	33 (55)	0,792
	>75%	85 (47)	27 (45)	
GRPRPORC	<75%	134 (75,7)	51 (86,4)	0,083
	>75%	43 (24,3)	8 (13,6)	
CXCR4PORC	<75%	107 (59,1)	37 (61,7)	0,727
	>75%	74 (40,9)	23 (38,3)	
GPR54PORC	<75%	112 (62,6)	40 (69)	0,377
	>75%	67 (37,4)	18 (31)	
CXCR4 nuclear	<10%	93 (52,2)	31 (52,5)	0,969
	>10%	85 (47,8)	28 (47,5)	
GPR54 nuclear	<10%	60 (33,5)	22 (37,9)	0,539
	>10%	119 (66,5)	36 (62,1)	

**Legenda:** cT – estadiamento clínico para o tamanho do tumor; cN – estadiamento clínico para a presença de linfonodos clinicamente positivos (segundo TNM – UICC, 2002). \*Foram considerados apenas os casos válidos.

No entanto, os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), GRPR ( $p=0,083$ ) e PAR1 ( $0,200$ ), atingiram o valor de  $p$  necessário para avaliação de significância estatística na análise multivariada.

### **7.3.2 Análise Multivariada**

Estádio clínico N (cN) ( $p<0,001$ ), invasão angiolinfática ( $p<0,001$ ), invasão perineural ( $p<0,001$ ), grau de diferenciação ( $p=0,002$ ), invasão de uretra ( $p=0,002$ ), estágio clínico T (cT) ( $p=0,005$ ), invasão de corpo cavernoso ( $p=0,008$ ), porcentagem de células coradas para GRPR (GRPRPORC) ( $p=0,083$ ), invasão de corpo esponjoso ( $p=0,098$ ), espessura tumoral ( $p=0,113$ ), postectomia ( $p=0,147$ ), invasão de órgãos adjacentes ( $p=0,189$ ) e porcentagem de células coradas para o PAR1 (PAR1PORC) ( $p=0,200$ ) atingiram valor de  $p$  de até  $0,20$  e foram incluídas no modelo para análise multivariada (Tabela 26).

**Tabela 26** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para metástases em linfonodos. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p(x <sup>2</sup> )
Estádio Clínico (cN)	< 0,001
Invasão Angiolinfática	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Grau de Diferenciação	0,002
Invasão de Uretra	0,002
Estádio Clínico T (cT)	0,005
Invasão de Corpo Cavernoso	0,008
<b>GRPRPORC</b>	0,083
Invasão de Corpo Esponjoso	0,098
Espessura tumoral	0,113
Postectomia	0,147
Invasão de Órgãos Adjacentes	0,189
<b>PAR1PORC</b>	0,200

PAR1PORC: percentual de marcação ao PAR; GRPRPORC: percentual de marcação ao GRPR. Avaliação através de percentual de área marcada pelo ACIS III.

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o estadiamento clínico N (RR = 14,1; IC 95% [5,4 – 37]), invasão perineural (RR = 6,92; IC 95% [3,19 – 15]) e o grau de diferenciação histológica tumoral (RR = 8,48; IC 95% [1,7 – 42,2]) foram os fatores independentes de risco para comprometimento metastático dos linfonodos. Enquanto que invasão angiolinfática, invasão de uretra, estágio clínico T, invasão de corpo cavernoso, **GRPRPORC**, invasão de corpo esponjoso, espessura tumoral, postectomia, invasão de órgãos adjacentes e **PAR1PORC** não estiveram associados de forma significativa para risco de metástases para linfonodos.

## 7.4 ASPECTOS RELACIONADOS AO SEGUIMENTO E À SITUAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

Os dados de seguimento foram obtidos em todos os 248 pacientes, sendo que o seguimento variou de 0,1 a 434 meses, com média de 98 meses e mediana de 64 meses.

Em 62 pacientes (25,3%) foi observada uma recorrência tumoral. Destes, 49 (19,7%) apresentaram recidiva locorregional; oito (3,6%), recidiva apenas à distância e cinco (2%), recidiva locorregional e à distância. Em dez pacientes (4%) não foi possível obter tal informação. Nenhuma recidiva foi observada em 175 (70,6%) pacientes.

Ao final do seguimento 86 pacientes (34,7%) encontravam-se vivos e sem doença; 15 (6%) vivos com doença; 46 (18,5%) morreram em decorrência do câncer ou de complicações do tratamento (incluindo óbitos nos primeiros 30 dias após a cirurgia); 81 (32,7%) falecidos por outras causas e 20 (8,1%) perdidos do seguimento (Tabela 27).

**Tabela 27** - Situação clínica dos 248 pacientes com Carcinoma Epidermóide usual de pênis, após atualização dos dados.

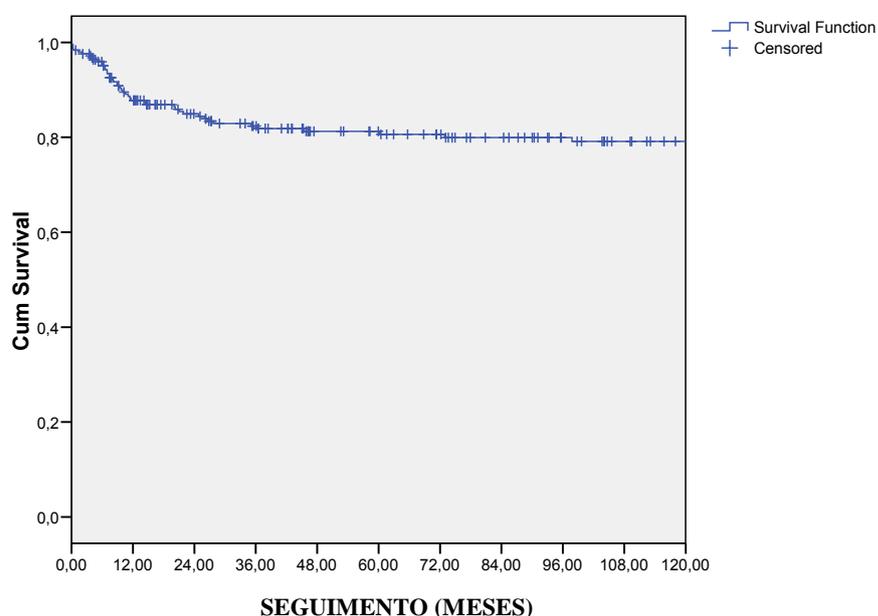
Situação Clínica	Número de Pacientes	%
Vivos sem doença	86	34,7
Vivos com doença	15	6
Óbito por câncer ou complicação do tratamento	46	18,5
Óbito por outra causa	81	32,7
Perdidos de seguimento	20	8,1

## 7.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA

### 7.5.1 Sobrevida Câncer Específica

#### ✓ Análise Univariada

A taxa de Sobrevida Câncer Específica para população estudada foi de 81,3% em cinco anos e 79,1% em 10 anos, como mostra a Figura 9.



**Figura 9** - Curva de sobrevida câncer específica para os 248 pacientes portadores de Câncer Epidermóide Usual do Pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, a que influenciou significativamente a sobrevida câncer específica foi o estadiamento clínico N ( $p < 0,001$ ) e intenção do esvaziamento ( $p = 0,029$ ). Idade ( $p = 0,355$ ), raça ( $p = 0,838$ ), tempo de evolução antes da primeira consulta ( $p = 0,844$ ), antecedentes venéreos ( $p = 0,310$ ), postectomia ( $p = 0,096$ ) e estágio clínico T

( $p=0,210$ ) não atingiram significância estatística para sobrevida câncer específica (Tabela 28).

**Tabela 28** - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual do pênis.

Variável	Categoria	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos (%)	p(log rank)
Idade	Menor que 60 anos	82,8	0,355
	Maior que 60 anos	78,1	
Raça	Branco	80,5	0,838
	Não branco	83,6	
Tempo de evolução antes da primeira consulta	Até 6 meses	79,4	0,844
	Mais que 6 meses	84,4	
Antecedentes venéreos	Não	83,1	0,310
	Sim	87,8	
Postectomia	Não	79,6	0,096
	Sim	90,2	
Estadiamento cT	T1	92,4	0,210
	T2	83,6	
	T3	77,5	
	T4	64,3	
Estadiamento cN	N0	89,6	<0,001**
	N1	78,5	
	N2	74,8	
	N3	16,7	
Intenção do Esvaziamento linfonodal	Princípio	88,9	0,029**
	Necessidade	66,3	

\*Excluídos casos sem informação

\*\*Variáveis selecionadas para regressão de Cox

Com relação as variáveis anatomopatológicas, o grau de diferenciação ( $p=0,002$ ), a invasão angiolinfática ( $p=0,021$ ), a invasão perineural ( $p<0,001$ ), a metástase para linfonodos ( $p=0,001$ ) e a espessura tumoral ( $p=0,005$ ) influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica, ao passo que infiltração de corpo cavernoso ( $p=0,341$ ), infiltração

de corpo esponjoso ( $p=0,869$ ), infiltração de uretra ( $p=0,438$ ), coilocitose ( $p=0,314$ ) e invasão de órgãos adjacentes ( $p=0,852$ ) não apresentaram significado estatístico para sobrevida câncer específica (Tabela 29).

**Tabela 29** - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas de 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos (%)	P (log rank)
<b>Grau de Diferenciação</b>	Baixo Grau	94,8	0,002**
	Grau Intermediário	85,6	
	Alto Grau	71,2	
<b>Grau de Diferenciação Estratifcado</b>	Baixo Grau	80,8	0,010**
	Alto grau (graus 2 e 3)	66,7	
<b>Espessura do Tumor</b>	Até 5mm	91	0,005
	Maior que 5mm	75,8	
<b>Invasão Angioinfática</b>	Ausente	85,9	0,021**
	Presente	70,7	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	88,7	0,001**
	Presente	66,3	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	84,4	0,869
	Presente	83,3	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	83,9	0,341
	Presente	78,4	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	84,3	0,438
	Presente	77,1	
<b>HPV (coilocitose)</b>	Ausente	75,9	0,314
	Presente	81,1	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	80,8	0,852
	Presente	66,7 (apenas 3 casos)	
<b>Metástase Linfonodal</b>	Negativo	89,6	<0,001**
	Positiva	72,6	

\*Excluídos casos sem informação

\*\*Variáveis selecionadas para regressão de Cox

Com relação à avaliação da imunorreatividade, EP2 (EP2PORC) ( $p=0,084$ ), PAR1 ( $p=0,919$ ), EP4 ( $p=0,461$ ), GRPR ( $p=0,794$ ), CXCR4 ( $p=0,686$ ), GRP54 ( $p=0,480$ ), CXCR4 nuclear ( $p=0,461$ ) e GPR54 ( $p=0,914$ )

nuclear não se associaram significativamente com sobrevida câncer específica em cinco anos (Tabela 30).

**Tabela 30** - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 anos de acordo com imunorreatividade aos GPCRs em 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos (%)	P (log rank)
PAR1PORC	< 5%	80,7	0,919
	>5%	81,7	
EP2PORC	<30%	66,7	0,084**
	>30%	80,9	
EP4PORC	<75%	79,1	0,461
	>75%	81,2	
GRPRPORC	<75%	80	0,794
	>75%	80	
CXCR4PORC	<75%	82,5	0,686
	>75%	78	
GPR54PORC	<75%	82,5	0,480
	>75%	77,6	
CXCR4 nuclear	<10%	79,8	0,461
	>10%	80,6	
GPR54 nuclear	<10%	82,2	0,914
	>10%	80,3	

**Legenda** – PAR1 PORC: percentual de marcação ao PAR; EP2PORC: percentual de marcação ao EP2; EP4PORC: percentual de marcação ao EP4; GRPRPORC: percentual de marcação ao GRPR; CXCR4PORC: percentual de marcação ao CXCR4; GPR54PORC: percentual de marcação ao GPR54; CXCR4 nuclear: percentual de marcação nuclear ao CXCR4; GPR54 nuclear: percentual de marcação nuclear ao GPR54. Avaliação através de percentual de área ou núcleos marcados pelo ACIS III.

\*Excluídos casos sem informação

\*\*Variáveis selecionadas para regressão de Cox

✓ **Análise Multivariada**

Como mostra a **Tabela 31** abaixo, estágio clínico N (cN) ( $p < 0,001$ ), invasão perineural ( $p < 0,001$ ), espessura do tumor ( $p = 0,005$ ), grau de diferenciação ( $p = 0,01$ ), invasão angiolinfática ( $p = 0,021$ ), intenção do esvaziamento ( $p = 0,026$ ), percentual de marcação para EP2 (EP2PORC) ( $p = 0,084$ ) e postectomia ( $p = 0,096$ ) apresentaram valor de p de até 0,20 e entraram no modelo de análise multivariada.

**Tabela 31** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada, para sobrevida câncer específica. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.

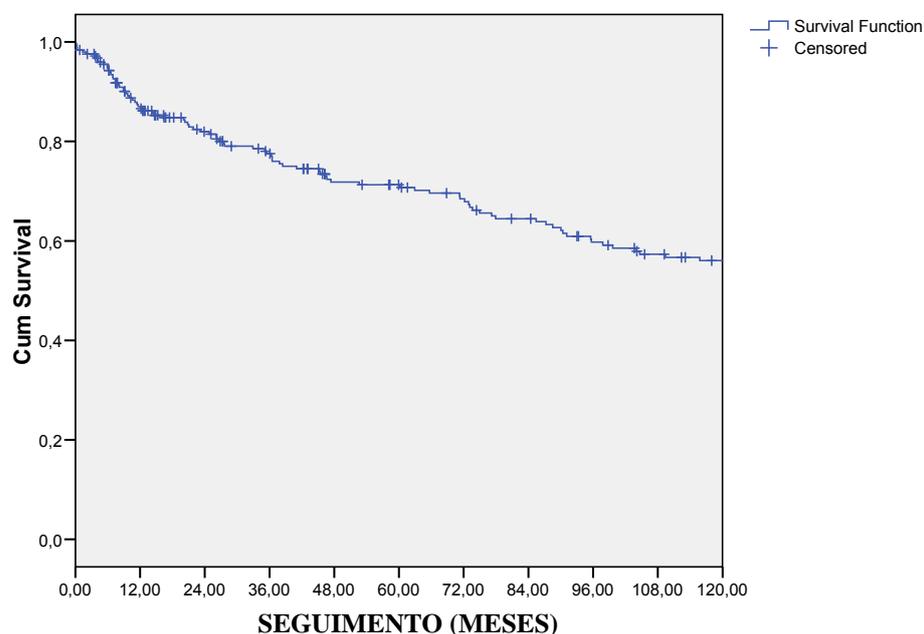
Variável	p(x <sup>2</sup> )
Estádio Clínico (cN)	< 0,001
Invasão Perineural	<0,001
Espessura do Tumor	0,005
Grau de Diferenciação	0,010
Invasão Angiolinfática	0,021
Intenção do Esvaziamento	0,026
<b>EP2PORC</b>	0,084
Postectomia	0,096

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, o estadiamento clínico N (RR = 1,71; IC 95% [1,14 – 2,57]), invasão perineural (RR = 1,73; IC 95% [1,15 – 2,6]) e o grau de diferenciação histológica tumoral (RR = 1,85; IC 95% [1,07 – 3,2]) foram os fatores independentes de risco para óbito por câncer.

## 7.5.2 Sobrevida Global

### ✓ Análise Univariada

A sobrevida global em cinco e em dez anos para os 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis foi de 71,3% e 56%, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10** - Curva de sobrevida global para 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual do pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas que influenciaram significativamente a sobrevida global estão a idade ( $p < 0,001$ ), postectomia ( $p = 0,006$ ) e o estadiamento clínico N ( $p < 0,001$ ). Raça ( $p = 0,165$ ), tempo de evolução antes da primeira consulta ( $p = 0,337$ ), antecedentes venéreos ( $p = 0,509$ ) e estágio clínico T ( $p = 0,063$ ), não influenciaram a sobrevida global em cinco anos (Tabela 32).

**Tabela 32** - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com as variáveis clínicas em 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	Sobrevida Global em 5 anos (%)	p(log rank)
Idade	Menor que 60 anos	77,6	<0,001**
	Maior que 60 anos	59,5	
Raça	Branco	69,5	0,165
	Não branco	77,1	
Tempo de evolução antes da primeira consulta	Até 6 meses	70,9	0,337
	Mais que 6 meses	73,2	
Antecedentes venéreos	Não	73	0,509
	Sim	76,2	
Postectomia	Não	67,6	0,006**
	Sim	86,9	
Estadiamento cT	T1	92,4	0,063**
	T2	72,2	
	T3	64,8	
	T4	64,3	
Estadiamento cN	N0	79,5	<0,001**
	N1	66,3	
	N2	64,6	
	N3	16,7	

\*Excluídos casos sem informação.

\*\*Variáveis selecionadas para a regressão de COX.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida global encontram-se: invasão angiolinfática ( $p=0,047$ ), grau de diferenciação ( $p=0,015$ ), espessura do tumor ( $p=0,044$ ), metástase linfonodal ( $p=0,001$ ) e invasão perineural ( $p<0,001$ ). Infiltração de corpo cavernoso ( $p=0,167$ ), infiltração de corpo esponjoso ( $p=0,171$ ), infiltração de uretra, ( $p=0,184$ ) coilocitose ( $p=0,747$ ) e infiltração de órgãos adjacentes ( $p=0,892$ ) não influenciaram significativamente a sobrevida global desse grupo de pacientes (Tabela 33).

**Tabela 33** - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	Sobrevida Global em 5 anos (%)	p(log rank)
<b>Grau de Diferenciação</b>	Baixo Grau	92	0,015**
	Grau Intermediário	69,5	
	Alto Grau	64	
<b>Grau de Diferenciação Estratificado</b>	Baixo Grau	92	0,005**
	Alto grau (graus 2 e 3)	66,7	
<b>Espessura do Tumor</b>	Até 5mm	80,6	0,044
	Maior que 5mm	66,2	
<b>Invasão Angioinfática</b>	Ausente	77,4	0,047**
	Presente	54,7	
<b>Invasão Perineural</b>	Ausente	76,9	<0,001**
	Presente	59,6	
<b>Infiltração de Corpo Esponjoso</b>	Ausente	84,4	0,171**
	Presente	73,6	
<b>Infiltração de Corpo Cavernoso</b>	Ausente	79,1	0,167**
	Presente	65,7	
<b>Infiltração de Uretra</b>	Ausente	76,2	0,184**
	Presente	63,3	
<b>HPV (coilocitose)</b>	Ausente	65	0,747
	Presente	70,1	
<b>Invasão de Órgãos Adjacentes</b>	Ausente	70	0,892
	Presente	66,7 (3 casos)	
<b>Metástase Linfonodal</b>	Negativo	79,5	0,001**
	Positiva	62,5	

\*Excluídos casos sem informação.

\*\*Variáveis selecionadas para regressão de COX.

Com relação a imunorreatividade aos GPCRs, observou-se que apenas a imunorreatividade ao PAR1 (PAR1PORC) foi associado significativamente com maior sobrevida global para aqueles com imunorreatividade em mais de 5% das células marcadas ( $p=0,012$ ), na análise univariada, enquanto a imunorreatividade para EP2 ( $p=0,999$ ), EP4 ( $p=0,618$ ), GRPR ( $p=0,798$ ), CXCR4 ( $p=0,626$ ), GPR54 ( $p=0,696$ ), CXCR4 nuclear ( $p=0,339$ ) e GPR54 nuclear ( $p=0,362$ ) não apresentaram associação

significativa com sobrevida global entre os 248 pacientes portadores de carcinoma epidermóide usual de pênis (Tabela 34).

**Tabela 34** - Probabilidade acumulada de sobrevida global em 5 anos de acordo com a imunorreatividade aos GPCRs em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

Variável	Categoria	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos (%)	P (log rank)
PAR1PORC	< 5%	65	0,012
	>5%	74,1	
EP2PORC	<30%	63,2	0,999
	>30%	72,3	
EP4PORC	<75%	70,1	0,618
	>75%	73,4	
GRPRPORC	<75%	72,6	0,798
	>75%	67,3	
CXCR4PORC	<75%	71,8	0,626
	>75%	69,6	
GPR54PORC	<75%	75,6	0,696
	>75%	64,5	
CXCR4 nuclear	<10%	70,8	0,339
	>10%	72,1	
GPR54 nuclear	<10%	70,7	0,362
	>10%	72,9	

**Legenda** – PAR1 PORC: percentual de marcação ao PAR; EP2PORC: percentual de marcação ao EP2; EP4PORC: percentual de marcação ao EP4; GRPRPORC: percentual de marcação ao GRPR; CXCR4PORC: percentual de marcação ao CXCR4; GPR54PORC: percentual de marcação ao GPR54; CXCR4 nuclear: percentual de marcação nuclear ao CXCR4; GPR54 nuclear: percentual de marcação nuclear ao GPR54. Avaliação através de percentual de área ou núcleos marcados pelo ACIS III.

#### ✓ **Análise Multivariada**

Para o modelo de análise multivariada foram selecionadas as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e com valores de p de até 0,20. Idade, estágio clínico N (cN), invasão perineural, grau de diferenciação, postectomia, imunorreatividade para o PAR1

(PAR1PORC), espessura tumoral, invasão angiolinfática, estágio clínico T (cT), raça, infiltração de corpo cavernoso, infiltração de corpo esponjoso e infiltração de uretra são listadas na **Tabela 35**, em ordem de entrada, para análise multivariada.

**Tabela 35** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada, para sobrevida global. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p(x <sup>2</sup> )
Idade	< 0,001
Estádio Clínico (cN)	< 0,001
Invasão Perineural	<0,001
Grau de Diferenciação	0,005
Postectomia	0,006
<b>PAR1PORC</b>	0,012
Espessura Tumoral	0,044
Invasão Angiolinfática	0,047
Estádio Clínico (cT)	0,063
Raça	0,165
Infiltração de Corpo Cavernoso	0,167
Infiltração de Corpo Esponjoso	0,171
Infiltração de Uretra	0,184

No modelo multivariado a idade (RR = 2,44; IC 95% [1,6 – 3,7], o estadiamento clínico N (RR = 1,73; IC 95% [1,13 – 2,65]), a invasão perineural (RR = 1,84; IC 95% [1,20 – 2,83]) e o grau de diferenciação histológica tumoral (RR = 2,42; IC 95% [1,31 – 4,47]) e postectomia (RR = 2,07; IC 95% [1,03 – 4,17]) foram os fatores independentes de risco para óbito por qualquer causa.

## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 ASPECTOS GERAIS

O câncer do pênis é uma neoplasia rara nos países desenvolvidos e provavelmente por isso 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) onde a incidência desta neoplasia é maior.

Os altos 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).

Embora fatores clínicos e anatomopatológicos tenham certo valor prognóstico, a presença de metástase para linfonodos ainda é o fator mais importante na evolução e sobrevida (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977; NARAYANA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996a).

SUFRIN e HUBEN (1987) estudaram a sobrevida de várias séries e encontraram sobrevida global de 51,6%. Considerando-se pacientes com

linfonodos comprometidos e não comprometidos, 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 para linfonodos, enquanto SRINIVAS et al. 1987 apresentaram índices de 28% e 74% respectivamente. Na série de GUIMARÃES (2003), com 125 pacientes, a sobrevida em 5 e 10 anos para pacientes com e sem metástase em linfonodos foi de 38,6% e 84,5% e de 30,5% e 61,5% respectivamente. Em nossa série a sobrevida em cinco e dez anos para pacientes com metástase e sem metástases para linfonodos foi de 44,1% e 82,3% e de 32,4% e 60,2%, respectivamente, resultados bem aproximados ao da literatura.

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

## **8.2 IMUNOISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G**

Em nossa série além de fatores clínicos, demográficos e anatomopatológicos clássicos, foi avaliada a imunorreatividade aos receptores associados à proteína G (GPCRs).

O intuito de avaliar o papel dos receptores acoplados a proteínas G no carcinoma de pênis surgiu através da revisão da literatura mostrar que tais receptores têm sua função usurpada nos processos neoplásicos o que contribui para os mecanismos de invasividade, proliferação e metástases de diversos tumores (DORSAN et al. 2007), mais notadamente em carcinomas de cabeça e pescoço e de mama (ONDREY et al. 1999; LIU et al. 2001; MULLER et al. 2001; LANGO et al. 2002; ALMOFTI et al. 2004; BOIRE et al. 2005; THOMAS et al. 2005).

Esses receptores têm sido estudados em diferentes neoplasias através de diferentes metodologias, mais comumente com Western Blotting ou detecção de RNAm com RT-PCR. O uso de técnicas distintas leva a resultados variáveis na distribuição do receptor. Ainda que o mesmo método tenha sido utilizado, a quantificação dos resultados não foi uniforme entre os autores.

Diferente de outros estudos com esses receptores, alguns com resultados conflitantes, o presente estudo é representado por uma população com cerca de 250 pacientes, composta de histologia homogênea (carcinoma epidermóide usual), com longo seguimento mediano (98 meses),

cujo material anátomopatológico foi bem conservado, conforme estudos prévios (SOUZA NETO 2008), o que fortalece ainda mais os seus resultados.

Nós optamos pela avaliação imunoistoquímica para nossa análise, porque ela é considerada uma tecnologia simples e acessível que já faz parte da rotina diária do patologista e, além disso, a imunoistoquímica preserva a arquitetura e a morfologia celulares, o que permite que as imunorreações possam ser atribuídas a subpopulações específicas.

Até o momento não é do nosso conhecimento outros estudos avaliando o **status** de expressão desses receptores no carcinoma de pênis e, dessa forma, seus resultados também ajudarão à comunidade científica quanto ao conhecimento sobre o padrão de expressão imunoistoquímica desses marcadores nesse tumor.

Como já citado anteriormente, vários estudos têm avaliado os receptores acoplados à proteína G (GPCR) e seu papel em diversos processos da carcinogênese de tipos de câncer, incluindo mama, cabeça e pescoço, próstata e pâncreas. Em muitos desses estudos foi observada uma correlação entre GPCR e risco de comprometimento linfonodal e piora na sobrevida, embora muitos resultados sejam ainda conflitantes, permanecendo ainda incerto se a expressão de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) é apenas um marcador tumoral ou se sinaliza um comportamento biológico agressivo de certas neoplasias.

A seguir, discutiremos os resultados obtidos a partir da avaliação imunoistoquímica de seis destes receptores (PAR-1, GRPR, EP2, EP4,

CXCR4 e GPR54) em 248 casos de carcinoma epidermóide usual, avaliados em nossa instituição.

### **8.2.1 PAR1**

A evidência acumulada na literatura sugere que a trombina e seus receptores podem ter um papel importante no processo de metástase. Trombina é uma serina protease que é gerada após o dano da célula endotelial. Além das suas funções na coagulação sanguínea, adesão plaquetária e mitose de células musculares lisas e fibroblastos, tem se observado que a trombina também participa do processo metastático (NIERODZIK et al. 1992; WOJTUKIEWICZ et al. 1992, 1993; WALZ e FENTON 1995; GRAND et al. 1996).

Muitos dos efeitos da trombina são mediados através de seus receptores, incluindo o PAR-1, seu principal receptor, um único polipeptídeo de 66kDa, codificado de um cDNA de 3.5kb, seqüenciada inicialmente por VU et al. (1991). Apesar de ser detectado em vários tipos de câncer humano, o verdadeiro papel do PAR-1 na metástase não está totalmente definido nas publicações atuais. EVEN-RAM et al. (1998) e HENRIKSON et al. (1999) demonstraram que PAR-1 foi expresso em altos níveis em linhagens de carcinoma de mama altamente metastáticos quando comparados com linhagens de células de carcinoma de mama com baixo potencial metastático. LIU et al. (2001) observou em tumores epidermóides de cavidade oral que maiores níveis de PAR-1 foram expressos em células metastáticas e que tais células tiveram seu crescimento estimulado quando

expostas à trombina. A trombina também induziu a atividade de metaloproteinases 2 e 9 nas células metastáticas, sugerindo o papel do PAR-1 no crescimento e potencial invasivo do carcinoma epidermóide de cavidade oral (LIU et al. 2001).

No entanto, LIU et al. (2001), HUANG et al. (2000) e ZAIN et al. (2000), têm demonstrado baixas concentrações de trombina nos tumores com alta taxa de crescimento, ao passo que maiores concentrações de trombina prejudicam o crescimento tumoral e induzem apoptose. Tanto a inibição do crescimento quanto a apoptose foram específicos para PAR-1, independentes de p53, dependentes de STAT-1 e associados com aumento de p21 e caspases (ZAIN et al. 2000; HUANG et al. 2000). Também em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, ZHANG et al (2004) observaram que tumores metastáticos para linfonodos apresentaram um menor percentual de células PAR-1 positivas e uma menor expressão de RNAm de PAR-1 que os tumores sem linfonodos comprometidos. Nesse estudo os autores observaram que os níveis de expressão de PAR-1 estavam positivamente correlacionados com marcadores de diferenciação de queratinócitos e que a via de sinalização do PAR-1 induz a expressão de marcadores de diferenciação em células de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Em nossa série foi observada uma associação inversa entre a positividade de células para o PAR-1 e a presença de linfonodos comprometidos ao exame clínico (cN). Este resultado é semelhante ao observado por ZHANG et al. (2004) com 34 pacientes com carcinoma

epidermóide de cabeça e pescoço. Naquele estudo, ZHANG et al. (2004) observaram uma menor percentagem de células positivas bem como uma menor expressão de PAR-1 entre os tumores com metástases para linfonodos. Paralelamente, os tumores com maior porcentagem de células positivas e maior expressão de PAR-1 apresentaram correlação positiva com os marcadores de diferenciação de queratinócitos, keratin-1, keratin-10 e keratin-11.

Observamos em nossa série uma associação com a invasão de órgãos adjacentes, porém o número pequeno de casos com tal invasão não nos permite tirar maiores conclusões. Não houve associação com grau de diferenciação, invasão angiolinfática, invasão perineural, invasão de corpo esponjoso, invasão de corpo cavernoso, invasão de uretra ou coilocitose.

Não foi observada correlação com a presença de comprometimento linfonodal ao exame anátomopatológico, nem com a sobrevida câncer específica em cinco anos. No entanto, observou-se associação da expressão maior que 5% nas células para o PAR-1 e maior sobrevida global em cinco anos, apenas na análise univariada. Esse dado pode ter resultado também da associação entre maior expressão do PAR-1 e a ausência de comprometimento clínico linfonodal, na análise univariada em nossa série, o que pode representar um achado parecido com aquele observado por ZHANG et al. (2004).

Por outro lado, uma menor sobrevida entre pacientes com carcinoma de não pequenas células de pulmão, estágio precoce (IB) ressecados, que expressam PAR-1 e PAR-4 foi observada por GHIO et al. (2006). Em sua

série, GHIO et al. (2006) observaram uma correlação significativa entre a expressão de PAR-1 e/ou PAR-4 e a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), podendo ser esta a explicação para a menor sobrevida.

A diversidade e a complexidade das vias de transdução de sinal mediadas por PAR-1 refletem a especificidade do tipo celular. Se PAR-1 correlaciona-se com risco para metástases ainda não está claro na literatura, e, portanto, deve ser definido para cada tipo celular específico.

A avaliação da expressão de PAR-1 nos diversos estudos até agora discutidos foi feita por imunohistoquímica, Western Blotting e RT-PCR. O estudo de GHIO et al. (2006) realizou avaliação tanto por imunohistoquímica quanto por RT-PCR. A avaliação imunohistoquímica desse estudo foi feita pela multiplicação de escores subjetivos atribuídos tanto para a intensidade de marcação (fraca, moderada, forte) quanto para o percentual de células marcadas. A literatura não é homogênea quanto ao ponto de corte utilizado e a maioria se baseia em escores subjetivos.

Nosso estudo é um dos primeiros a analisar dados de intensidade e percentagem de células positivas através de um programa que digitaliza as imagens e dá os resultados através de intensidade (*pixels*) determinada pela reação imunohistoquímica e o percentual de células marcadas observado pelo programa de computador, plataforma ACIS III.

Tendo em vista que não houve diferença estatística entre os diversos testes realizados para intensidades com relação às variáveis analisadas, utilizamos o ponto de corte de 5% de células marcadas, que foi o que esteve

associado significativamente com estágio clínico N e sobrevida global. Não foram observadas associações estatísticas para outros pontos de corte utilizados, após estratificação a partir do percentil 10.

### **8.2.2 GRPR**

Espécimes de câncer de próstata foram relatados serem 100% positivas para GRPR por diferentes autores e métodos (hibridação in situ, RT-PCR, Western Blotting) (BARTHOLDI et al. 1998; MARKWALDER e REUBI 1999; REUBI et al. 2002). Baseados nesses achados, foi postulado que esses receptores poderiam ser úteis para diferenciação entre hiperplasia e neoplasia. CHAVE et al. (2000) avaliaram tecidos colorretais normais e neoplásicos e detectaram GRPR em todas as amostras, com superexpressão apenas nos tumores, reforçando a possibilidade do peptídeo liberador de gastrina (GRP) agir como um fator de crescimento autócrino. PANSKY et al. (2000) também demonstraram a expressão em carcinoma de células renais, mas não em tecido renal normal. Outros pesquisadores reforçaram o papel do GRP no desenvolvimento do câncer pelos seus resultados em pacientes com neuroblastomas (SEBESTA et al. 2001) bem como em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (LANGO et al. 2002), onde o receptor foi encontrado em todos os tecidos tumorais analisados. Em resumo, a expressão de GRPR é muito mais comumente encontrada em neoplasias que em tecidos humanos normais.

LANGO et al. (2002) notou que tumores e mucosas de pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço tinham expressão de RNAm seis

e quatro vezes maior que mucosa de pacientes sem tumores e ainda observaram que linhagens celulares de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço foram estimuladas com a adição de GRP (ligante do GRPR) e tiveram sua proliferação inibida quando adicionado anticorpos neutralizantes para GRP. Observaram também que pacientes com baixa expressão de GRPR tiveram maior sobrevida que o grupo de maior expressão. Esse mesmo autor observou uma tendência para comprometimento linfonodal nos pacientes com maior expressão de RNAm para GRPR e uma associação significativa com grau de diferenciação e disseminação extracapsular.

TAGLIA et al. (2007) utilizando diferentes metodologias (cultura de células, imunistoquímica, microscopia confocal e ensaios de motilidade) observou que células de carcinoma colorretal que expressaram maior quantidade de GRPR tinham histologia mais bem diferenciada, maior ligação a matrix extracelular e menor risco de metástase, e esse resultado se deveu a maior expressão da molécula de adesão ICAM-1 mediada via FAK quinase. Na verdade, células normais de carcinoma colorretal não expressam GRPR e sua expressão aberrante promoveu um fenótipo mais bem diferenciado, regulando a motilidade celular e aumentando a aderência à matrix extracelular, prevenindo metástases.

Outros tipos de câncer mostraram a mesma expressão difusa do GRPR encontrada por nós. CORNELIO et al. (2007), avaliando 88 casos de tumores de colo uterino e 14 controles de colo uterino normal, encontrou uma imunorreatividade difusa em 99% das lesões neoplásicas, com a maioria exibindo padrão de marcação forte. A expressão estava

principalmente localizada na endocérvix e nos tecidos da ectocérvix adjacentes aos tumores, enquanto nenhuma expressão foi identificada na ectocérvix normal. Tal achado levou os autores a sugerirem que a presença desse receptor tanto nos tumores quanto nos tecidos adjacentes pode ter um papel importante no processo de carcinogênese.

Nossa série também encontrou achados semelhantes aqueles de CORNELIO et al. (2007) com a maioria dos casos apresentando imunorreatividade difusa.

Com relação às associações, na análise univariada, observou-se uma associação estatística significativa entre a porcentagem de células marcadas para GRPR > 75% e um menor acometimento de linfonodos, pelo estadiamento clínico do linfonodo (cN). Entre os pacientes sem invasão perineural houve associação significativa com menor expressão de GRPR e também os tumores mais indiferenciados apresentavam uma expressão de GRPR em menos que 75% das células. Nós não obtivemos resultados semelhantes aos de TAGLIA et al. (2007) que observou que a maior expressão do GRPR estava associada com tumores mais bem diferenciados, quando estudou adenocarcinoma colorretais, talvez por nossa série ser representada em sua maioria por tumores de alto grau histológico (graus 2 e 3). No entanto entre os tumores de alto grau, a maioria tinha uma baixa expressão de GRPR e houve significado estatístico, como já mencionado.

Ainda mantendo-se em consonância com os resultados de TAGLIA et al. (2007), nossa série mostrou que tumores com maior expressão de GRPR

tinham menos acometimento de linfonodos no estadiamento clínico (cN) e uma tendência a menor acometimento de linfonodos quando avaliados pela patologia, porém tal resultado não se manteve na análise multivariada. Com relação aos achados para acometimento de linfonodos, nossos achados diferem daqueles de LANGO et al. (2002) que estudou carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, através de RT-PCR e observou que uma maior expressão de GRPR estava associada com uma tendência a maior risco de acometimento de linfonodos. O mesmo autor não explica o tipo de associação que obteve entre a expressão do receptor e o grau de diferenciação celular.

O ponto de corte utilizado em nossa série é diferente daquele utilizado por SCOTT et al. (2004) em tumores carcinóides gastrointestinais e por CORNELIO et al. (2007), em tumores de colo uterino. Ambos utilizaram um escore que dividia os tumores em cinco grupos: nenhuma célula corada, 0 ponto; < 10% de células coradas, 1 ponto; 10-50% das células coradas, 2 pontos; 50-90% das células coradas, 4 pontos; > 90% das células coradas, 5 pontos. Além disso, ambos autores utilizaram a soma do percentual das células marcadas com um outro escore atribuído para a avaliação subjetiva da intensidade da reação imunoistoquímica. Esses são os dois estudos revisados que utilizam a pesquisa do GRPR por imunoistoquímica. Após várias tentativas para desenvolver um escore de soma ou multiplicação entre intensidade e percentagem de células marcadas, obtivemos associação estatística entre a porcentagem de células marcadas maior ou menor que 75% e três variáveis consideradas importantes no prognóstico do câncer de

pênis: estadiamento clínico N, invasão perineural e grau de diferenciação. Por isso, utilizamos este valor como ponto de corte.

Atualmente é conhecido o papel dos GRPR como mediadores da ativação do receptor para fator de crescimento epidermal tipo 1 (EGFR1), cujo papel já é conhecido na carcinogênese de tumores de cabeça e pescoço. Vários autores têm observado essa transativação por diferentes métodos como culturas de células, imunistoquímica e RT-PCR (LUI et al. 2003; LIU et al. 2007; SEETHALA et al. 2008) e descobriram que o GRPR, uma vez ativado, induz a liberação do TGF-alfa da matriz extracelular, que por sua vez ativa o EGFR1.

O estudo da expressão imunistoquímica do EGFR1 em carcinoma epidermóide usual de pênis pode ajudar ainda mais na interpretação dos resultados por nós encontrados através da avaliação da correlação entre a expressão do EGFR1 e do GRPR nesta neoplasia.

### **8.2.3 EP2 e EP4**

As cicloxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) são enzimas “*passo limitante*” envolvidas na conversão do ácido araquidônico a prostanóides. COX-1 é considerado um gene “*housekeeping*” responsável por várias funções fisiológicas tais como citoproteção do estômago, vasodilatação renal e produção de prostanóides pró-agregantes pelas plaquetas, como o tromboxane. Recentemente tem sido sugerido que o COX-2, que foi isolado como um gene de indução precoce, pode ter várias outras funções além daquelas bem conhecidas nas reações inflamatórias. É sabido que COX-2

está associada à carcinogênese colorretal, conforme observado por OSHIMA et al. (1996) que evidenciou uma supressão de pólipos colônicos nos descendentes de camundongos com deleção do gene *Apc* que cruzaram com camundongos com deleção do gene da COX-2.

HIDA et al. (1998), avaliou 59 casos de câncer de pulmão por imunohistoquímica e observou que houve uma expressão significativa de COX-2 nos casos de adenocarcinoma e que as outras histologias apresentaram imunorreatividade fraca ou ausente. BROUXHON et al. (2007) observou a sequência de progressão no desenvolvimento de carcinoma de células escamosas “*in vitro*” e eventos como a perda da expressão de E-caderina e aumento da expressão de prostaglandina E2. Seus resultados mostraram que havia um aumento progressivo da expressão de PGE2 com a progressão para carcinoma escamoso e perda de E-caderina e que a progressão era evitada quando se associava indometacina ou se bloqueava o receptor EP2, enquanto sua progressão foi acelerada com adição de um agonista do receptor EP2 (budaprost), encontrando mais uma ligação entre PGE2/EP2 e câncer (BROUXHON et al. 2007). MA et al. (2006) estudou células de câncer de mama *in vitro* e observou, através de ensaios de migração, a inibição de migração e metástase através de um antagonista específico do receptor EP4 (AH23848) e tal efeito foi comparável aquele obtido pela inibição combinada da COX-1 e COX-2.

Esses e outros estudos são evidências laboratoriais e clínicas da relação entre inflamação e câncer, através das vias iniciadas pela prostaglandina E2 e seus receptores.

✓ **EP2**

Na literatura revisada não havia dados de escores para avaliação imunohistoquímica do receptor EP2 ou EP4. A maioria dos estudos publicados utilizou-se de cultura de células. Por isso, inicialmente dividimos as porcentagens de marcação de nossa série dos percentis 10 a 90 e realizamos todas as avaliações estatísticas com relação às associações com as variáveis clínicas, demográficas e anátomo-patológicas. Também, não encontramos associação com as variáveis quando estratificados os percentuais de células positivas em menor que 10%, 10%-90% e maior que 90%, conforme realizado no trabalho de KUO et al. (2009).

Desta forma, consideramos o escore para ponto de corte aquele que apresentava associação estatística significativa com fatores sabidamente importantes do carcinoma peniano como o grau de diferenciação, a invasão angiolinfática, por exemplo.

Em nossa série, a imunorreatividade ao receptor EP2 foi dividida em dois grupos: menores e maiores que 30% de células marcadas (o percentil 30 foi o que apresentou associação com invasão angiolinfática).

Não foi observada associação estatística com as variáveis clínico-demográficas. Já com relação às variáveis anátomo-patológicas, observou-se associação apenas com a invasão angiolinfática, na análise univariada.

Desta forma, entre os pacientes sem invasão angiolinfática, a maioria expressava EP2 em mais que 30% das células tumorais (efeito protetor). No entanto, como houve apenas oito pacientes com baixa expressão e esses resultados necessitam serem confirmados com um número maior de

casos nos dois grupos. Esses dados são contrários aos relatados para COX-2 e seus receptores, por exemplo, que estão relacionados a crescimento, angiogênese e, portanto, a um maior potencial metastático e um prognóstico adverso (HIDA et al. 1998; LIN et al. 2002; CHANG et al. 2005). PAN et al. (2008) observaram que COX-2 aumentou a expressão de CCR7 via EP2 e EP4 e que a expressão de CCR7 em tumores de mama com alta expressão de COX-2 estava correlacionada com comprometimento linfonodal.

Por outro lado, a expressão de EP2 pode estar associada ao processo inflamatório e à presença de infiltrado inflamatório que é bastante observada nos casos de carcinoma de pênis. Intensa infiltração linfocitária está associada a menor incidência de comprometimento linfonodal e melhor sobrevida livre de doença e sobrevida global, embora LOPES et al. (1996b) não tenha observado diferenças estatisticamente significativas. No seu trabalho, LOPES et al (1996b) encontraram uma maior sobrevida livre de doença entre os pacientes com maior infiltrado eosinofílico. Nossa série observou que a maior expressão de EP2 foi fator protetor para a invasão angiolímfática, no entanto não avaliamos a relação desse dado com a infiltração linfocitária ou eosinofílica.

Não foi observada associação estatística entre a reatividade imunohistoquímica ao EP2 e a presença de comprometimento linfonodal, sobrevida câncer específica e sobrevida global.

No estudo de KUO et al. (2009), com 226 amostras de carcinoma escamoso de esôfago, o autor observou uma correlação positiva entre a maior expressão de EP2 e o estágio T e uma pior sobrevida global, na

análise univariada. Quando observada a maior expressão do EP2 nos pacientes com estágio T1-T3N0M0, EP2 tornou-se um fator independente de sobrevida global, porém não observou associação com idade, estágio clínico ou patológico dos linfonodos, invasão linfovascular ou diferenciação tumoral.

Por outro lado, MIYATA et al. (2006b) analisaram a expressão de receptores para prostaglandina E2 (EP1-EP4) em carcinoma de células transicionais e não encontraram associação entre a expressão dos subtipos EP1-EP3 com nenhuma variável patológica ou de sobrevida, ao passo que EP4 esteve associado à proliferação celular e metaloproteinase 2.

#### ✓ **EP4**

Com relação ao receptor EP4, houve associação estatística, na análise univariada, apenas com a variável clínico-demográfica estadiamento cN, de forma que aqueles casos considerados com linfonodos clinicamente positivos tiveram menor reatividade ao EP4 (porcentagem de células marcadas menor que 75%) e esta associação determinou o ponto de corte em 75%. Como esse resultado beira a significância estatística ele pode também ter acontecido ao acaso, haja vista o valor do  $p=0,047$ .

As demais variáveis clínico-demográficas não apresentaram associação estatística. Também não foi observada associação estatística significativa entre a reatividade imunohistoquímica ao EP4 e as variáveis anatomo-patológicas. Nem houve associação estatística entre a reatividade imunohistoquímica ao EP4 e a presença de comprometimento linfonodal, sobrevida câncer específica e sobrevida global.

MIYATA et al. (2006a) estudou, por imunistoquímica, a relação entre a imunexpressão dos diversos receptores de prostaglandina E2 (EP1, EP2, EP3 e EP4) com achados clínico-patológicos em tecido de câncer de próstata. Naquele estudo, com 122 pacientes, MIYATA et al. (2006a) observou que, apesar de todos os receptores serem mais expressos no tecido tumoral que em glândulas prostáticas normais, apenas o receptor EP1 apresentou associação estatística com variáveis clínico-patológicas que foram: escore de Gleason, estágio T, estágio N, estágio M e índice de proliferação de células neoplásicas.

Em resumo, nossos resultados com relação aos receptores de prostaglandina E2 analisados (EP2 e EP4) no carcinoma de células escamosas usual do pênis sugerem que sua imunexpressão parece não estar associada a um pior prognóstico. Este dado pode sugerir que, caso haja uma participação dos receptores de prostaglandinas na carcinogênese do carcinoma epidermóide de pênis, outros subtipos que não o EP2 e EP4 podem ter maior importância, como observado por MIYATA et al. (2006a) para o carcinoma de próstata.

Sabe-se que a carcinoma de pênis é um neoplasia de agressividade local e é possível que alguns mecanismos moleculares, ainda pouco conhecidos, possam corroborar para a pobre capacidade de disseminação hematogênica. Embora a expressão de EP2 e EP4 nas células tumorais, em nossa série, esteja associada a menor invasão angiolinfática e menor risco para linfonodos positivos no estadiamento clínico, respectivamente, os poucos trabalhos explorando o papel dos receptores de prostaglandina E2

nos mecanismos de invasão e metástases, apontam para um aumento do risco de disseminação metastática associado à expressão desses GPCRs.

#### **8.2.4 CXCR4**

Quimiocinas e seus respectivos receptores regulam a quimiotaxia e migração transendotelial de leucócitos durante a resposta imune e inflamatória (GONZALO et al. 2000). Tem sido relatado que as quimiocinas também são expressas em células neoplásicas de uma forma distinta e em um padrão não aleatório, tais como em câncer de mama, ovário, próstata, rim, cérebro, pulmão e tireóide (MULLER et al. 2001; SCOTTON et al. 2001; TAICHMAN et al. 2002; MOHLE et al. 2000; ZHOU et al. 2002; KIJIMA et al. 2002; HWANG et al. 2003).

A expressão de receptores de quimiocinas nas células neoplásicas, bem como a expressão de seus ligantes nos sítios de disseminação do câncer (MULLER et al. 2001; MURPHY et al. 2003) indicam que a metástase de células neoplásicas não é um processo aleatório, mas compartilha muitas semelhanças com o tráfego de leucócitos através de um gradiente de quimiocina. Embora diferentes tipos de células neoplásicas expressem diferentes receptores para quimiocinas, o receptor mais comumente expresso em células cancerígenas humanas é o CXCR4 que já foi observado em pelo menos 23 tipos diferentes de câncer, incluindo os de origem epitelial, mesenquimal e hematopoiética (BALKWILL 2004b).

Foi identificado que a expressão de CXCR4 está associada com metástase em certos tipos de câncer. Por exemplo, células de câncer de

ovário humano alteradas em laboratório ou naturalmente, expressam altos níveis de CXCR4 e estabelecem extensas metástases locais ou à distância quando elas crescem intraperitonealmente em camundongos *nude* (BALKWILL 2004a e b). Células de câncer de próstata expressando altos níveis de CXCR4 produzem maiores xenoenxertos cutâneos, com alta densidade de vasos sanguíneos e invasão vascular quando comparadas a células selvagens (BALKWILL 2004a e b). Em modelos de camundongos para melanoma, células transfectadas com CXCR4 mostram um aumento de dez vezes na chance de desenvolverem metástases pulmonares, quando comparados com células CXCR4 negativas (MURAKAMI et al. 2002) e a adesão dessas células expressando CXCR4 foi aumentada para células endoteliais da microvasculatura da derme e dos pulmões. ZHANG et al. (2007) avaliaram a expressão imunohistoquímica de CXCR4 em células de câncer cervical, linfonodos e cultura de células do mesmo câncer (HeLa) e encontrou que ambas as células (tecido ou cultivo), a despeito de metastatizar ou não para os linfonodos, expressaram CXCR4; ao passo que células de colo uterino normal não expressaram. (ZHANG et al. 2007). Além disso, todas as células que metastatizaram para os linfonodos eram CXCR4 positivas. E, ainda, SDF-1 $\alpha$  induziu a migração direta de células Hela em um modelo dependente de concentração, que foi inibido por anticorpos contra CXCR4 além de o SDF-1 $\alpha$  também estimular a proliferação de Hela mediada por CXCR4, no mesmo estudo.

UCHIDA et al. (2007) estudou carcinoma de células escamosas de cavidade oral e também observou a relação da alça CXCR4/SDF-1 $\alpha$  na

indução de proliferação, sobrevivência e invasão linfonodal, ressaltando as funções dessa alça de forma parácrina e autócrina para os mecanismos de proliferação e disseminação tumoral.

YU et al. (2008) estudou a expressão de CXCR4 em tecidos tumorais de 53 carcinomas colorretais e 27 tecidos de cólon normais por imunohistoquímica. Naquela série a expressão do CXCR4 foi significativamente maior nos pacientes com linfonodos comprometidos que naqueles sem linfonodos comprometidos (65,4% versus 25,9%) e também mais invasões linfáticas e vasculares.

O ponto de corte de 75% de células marcadas é diferente daquele utilizado por UCHIDA et al. (2007), 25% das células marcadas, em carcinoma epidermóide de cavidade oral; YU et al (2008), 50% das células marcadas, em adenocarcinoma colorretal. Nossa série conseguiu observar alguma associação estatística com invasão angiolinfática e grau de diferenciação quando considerou 75% das células marcadas como ponto de corte, sem observar nenhuma associação com os pontos de corte utilizados por outros autores.

No presente estudo a imunorreatividade do CXCR4 não esteve associada com as variáveis clínicas e demográficas. Por outro lado a positividade para o CXCR4 em mais de 75% das células estava associada com ausência de invasão angiolinfática e também foi encontrada associação significativa com grau de diferenciação, sendo que os pacientes considerados de alto grau (graus 2 e 3) tiveram menor expressão do CXCR4. Esses resultados são diferentes daqueles observados pela

literatura, principalmente para invasão angiolinfática onde se acredita que o CXCR4 tenha um papel importante na promoção desse evento, no entanto, outros mecanismos de invasão e metástases, que não dependentes do CXCR4 podem estar envolvidos, uma vez que o processo de metástase depende de múltiplos fatores. Além disso, nossa casuística associou a invasão vascular sanguínea com a linfática, como definida invasão angiolinfática, para todos os casos do banco de dados. Talvez, se considerássemos variáveis distintas poderíamos obter alguma associação estatística significativa.

ZHANG et al. (2007) estudando carcinoma epidermóide de colo uterino não observou associação estatística da expressão de CXCR4 com estádios do tumor ou grau de diferenciação, por exemplo. Embora o mesmo autor tenha observado que células desta neoplasia têm maior capacidade de migração quando expostas ao SDF1-alfa, no ensaio de migração. NA et al. (2008) também não observou associação estatística entre a expressão citoplasmática do CXCR4 e variáveis clínicas ou anátomo-patológicas, avaliando a expressão de CXCR4 em neoplasia de não pequenas células do pulmão. No entanto, os mesmos autores observaram um maior risco para comprometimento linfonodal quando avaliaram a expressão de CXCR4 para a mesma neoplasia.

Novos estudos têm avaliado por imunistoquímica a correlação entre a expressão nuclear de CXCR4 e metástases para linfonodos axilares no câncer de mama. Um deles encontrou uma correlação significativa entre uma alta expressão nuclear do CXCR4 e metástases linfáticas em pacientes

com câncer de mama e receptores hormonais negativos, sem observar associação com outras variáveis clínicas e patológicas tanto com a expressão nuclear quanto com a expressão citoplasmática (WOO et al. 2007). Uma correlação entre a expressão nuclear do CXCR4 e metástases em linfonodos também foi observada por Na I-K et al (2008) em tumores de pulmão de células não pequenas, não sendo observada correlação com a expressão citoplasmática (NA et al. 2008).

Em nossa série também observamos a expressão nuclear do CXCR4 em alguns casos. Esta expressão nuclear esteve associada com a raça branca e coilocitose. Sendo que, dentre os pacientes analisados para presença ou não de coilocitose (90/248), aqueles sem achados de coilocitose não apresentavam reatividade nuclear para o CXCR4 ( $p=0,022$ ).

Vários estudos têm observado a expressão nuclear de GPCRs em diversas neoplasias e muitos deles associam essa expressão com a produção de GPCRs induzidos por vírus. Uma maior discussão será feita a seguir, quando discutiremos a expressão nuclear de GPR54.

#### **8.2.5 GPR54**

Kissipeptinas são peptídeos produzidos a partir do gene humano Kiss-1 que atuam através da ligação com seu GPCR, GPR54, em diversas funções fisiológicas como puberdade e implantação da placenta no útero. Recentemente tem sido descoberta uma associação entre a expressão do GPR54 com fenômenos neoplásicos, particularmente, funcionando como um inibidor de metástases. A maioria dos estudos aponta para uma expressão

reduzida em neoplasias metastáticas e vários ensaios de migração e invasão têm observado que a deleção do gene Kiss-1 aumenta o potencial invasivo e migratório das células neoplásicas. Uma maior revisão dos aspectos fisiológicos e patológicos associados ao GPR54 e às kissipeptinas é encontrada em MEAD et al. (2007).

No entanto, fato contrário tem sido observado por MAROT et al. (2007) tanto em cultura de células de câncer de mama como em tecidos de pacientes com a mesma neoplasia. Em sua série, tumores de mama de mulheres pós-menopausadas que apresentaram altos os níveis de mRNA de Kiss-1 e GPR54 tiveram uma menor sobrevida livre de recaída em relação aqueles tumores com menores níveis de mRNA tumoral para ambos os genes.

PRENTICE et al. (2007) estudou a imunorreatividade de câncer de ovário às kissipeptinas e GPR54 por TMA e imunoistoquímica. Eles consideraram os casos positivos quando mais de 75% das células estavam marcadas para o GPR54. Seus resultados apontaram para uma sobrevida global significativamente maior entre os casos com alta expressão de GPR54 e também houve uma forte associação entre a alta expressão do GPR54 e kissipeptina com o subtipo de células claras. Dentro desse subtipo, a expressão do GPR54 também esteve associada com uma maior sobrevida global.

IKEGUCHI et al. (2004), avaliando a expressão de Kiss-1 e GPR54 (hOT1T175) no mRNA total extraído de tumores de esôfago e esôfago normal de 71 pacientes com câncer epidermóide de esôfago observou que a

perda da expressão desses genes não se correlacionou com parâmetros patológicos como grau de diferenciação, invasão de adventícia, invasão linfática, mas esteve relacionado com metástase para linfonodos e foi um significativo preditor para metástases para linfonodos na análise multivariada.

Em nossa série com 248 casos de carcinoma epidermóide usual de pênis a expressão imunohistoquímica do GPR54 foi considerada positiva quando observada em mais de 75% das células, conforme utilizado por PRENTICE et al. (2007), em vista do grande número de casos avaliados por eles com este ponto de corte (mais de 500 casos).

Em nossa série não observamos associação estatística entre a expressão citoplasmática de GPR54 e as variáveis clínico-demográficas analisadas. Houve uma tendência para associação estatística com invasão angiolinfática, sendo que entre os pacientes sem invasão angiolinfática, a maioria era negativa para GPR54 (menos de 75% das células marcadas), sugerindo um efeito protetor. IKEGUCHI et al. (2004) também não observou associação com invasão linfática, no entanto, a ausência de expressão de mRNA para GPR54 foi preditora de metástase para linfonodos.

Não houve associação estatística entre a presença de linfonodos comprometidos e a positividade para GPR54, sobrevida câncer específica em cinco anos ou sobrevida global.

Com relação à expressão nuclear do GPR54, não há relatos de tal expressão imunohistoquímica na literatura revisada. Nossa série é a primeira a observar expressão nuclear desse receptor. Há dados da literatura para expressão nuclear aberrante de outros receptores acoplados a proteína G

como é o caso do CXCR4 e receptores de prostaglandina E2, como o EP2, por exemplo KONGER et al. (2005) e WOO et al. (2007); porém sem nenhum relato para localização nuclear do GPR54.

É conhecido, no entanto, que os GPCRs podem apresentar localização aberrante, em diversos processos patológicos. Tal localização pode estar relacionada com outros mecanismos de sinalização intracelulares, acoplando os GPCR com outras vias de sinalização, como vias que sinalizam para o núcleo, sem necessariamente passarem por vias citoplasmáticas. Várias proteínas que induzem à endocitose desses receptores, como a clatrina, beta-arrestinas e quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs) podem estar ligadas a estes mecanismos de internalização e compartimentalização de vias de sinalização nucleares (ZHU et al. 2006; MOORE et al. 2007; HAMDAN et al. 2007; JIANG et al. 2007).

Em nossa série com 248 casos de carcinoma epidermóide usual do pênis não observamos associação significativa entre a expressão nuclear do GPR54 com as variáveis clínico-demográficas. No entanto, as variáveis anátomo-patológicas analisadas observou-se uma associação estatística apenas com coilocitose. Os pacientes em que foi observada coilocitose, a maioria tinha positividade nuclear para o GPR54. Não houve associação entre a expressão nuclear do GPR54 com a presença de metástases para linfonodos, com a sobrevida câncer específica ou com a sobrevida global.

Muitos trabalhos têm observado a relação entre a expressão GPCRs associados a certos vírus como herpes vírus, citomegalovírus e o vírus

Epstein-Barr e em outros trabalhos essa expressão de GPCR está associada com transformação celular, o que acontece com neoplasias como o sarcoma de Kaposi e o linfoma primário de efusão, por exemplo (DADKE et al. 2003; COUTY e GERSHENGORN 2004; VAN CLEEF et al. 2006; CANNON 2007; BEISSER et al. 2008; ZUO et al. 2009).

Até agora nenhum trabalho tem feito referência à expressão de GPCR pelo papilomavírus humano. Se a associação por nós encontrada entre coilocitose e expressão nuclear do GPR54 é devida ou não a presença do HPV, não pode ser determinado em nossa série, mas trabalhos poderão ser feitos para pesquisar a possível expressão de GPCRs pelo papilomavírus humano e seu papel na desenvolvimento do carcinoma peniano e também no câncer do colo uterino, abrindo uma nova linha de pesquisa para essas neoplasias.

### **8.3 ASPECTOS RELACIONADOS À SOBREVIDA**

Para análise de sobrevida foi utilizado todo o grupo avaliado. Apesar de serem incluídos pacientes perdidos durante o seguimento, estes representaram apenas 8% (20 pacientes), sendo que em sua maioria foram perdidos de seguimento após dois anos, tempo geralmente suficiente para recidiva como observado nesta e em outras séries do grupo (GUIMARÃES 2003), em que todos os pacientes recidivaram em até dois anos.

### **8.3.1 Sobrevida câncer específica**

Para análise foi considerada a taxa de sobrevida câncer específica em cinco e dez anos, sendo que a maioria das recidivas se deram nos dois primeiros anos e, quando ocorreram, foram responsáveis pela maioria dos óbitos nesse período.

A taxa de sobrevida câncer específica em cinco anos foi de 81,3%.

Dentre as variáveis clínico-demográficas avaliadas, estágio clínico N e intenção do esvaziamento linfonodal foram estatisticamente significativos na análise univariada.

Dentre as variáveis anátomo-patológicas foi observada associação estatística na análise univariada com grau de diferenciação, espessura tumoral, invasão angiolímfática, invasão perineural e comprometimento linfonodal.

A imunexpressão dos GPCRs não foi estatisticamente significativa para sobrevida câncer específica nas análise univariada ou multivariada. Sendo que as variáveis que permaneceram independentes para sobrevida câncer específica em cinco anos foram estadiamento clínico N, invasão perineural e grau de diferenciação histológica. Metástase linfonodal também permaneceu como fator independente mais importante para sobrevida câncer específica, no modelo multivariado.

### **8.3.2 Sobrevida global**

Para análise de sobrevida global foi considerada a taxa de sobrevida em cinco e dez anos.

A taxa de sobrevida global em cinco e dez anos para todo o grupo foi de 71,3% e 56%, respectivamente.

Dentre as variáveis clínico-demográficas avaliadas, apenas idade, postectomia e o estadiamento clínico N foram estatisticamente significativos na análise univariada.

Dentre as variáveis anátomo-patológicas significativas na análise univariada estão o grau de diferenciação, espessura do tumor, invasão angiolinfática, invasão perineural e metástase em linfonodos.

A imunoexpressão para PAR-1 se mostrou associada significativamente com sobrevida global, na análise univariada.

As variáveis que permaneceram como independentes para risco de óbito na análise multivariada da sobrevida global foram idade, estadiamento clínico N, invasão perineural, grau de diferenciação histológica, postectomia e comprometimento linfonodal.

A presença de postectomia no modelo final pode refletir o maior acesso aos serviços de saúde e, portanto uma detecção mais precoce da neoplasia de pênis, quando as possibilidades de cura são maiores.

A inclusão da idade no modelo final como fator independente para risco de óbito pela neoplasia é justificada pela incidência de carcinoma peniano em pacientes idosos, entre os quais o percentual de outras causas de óbito também foi alto. Desta forma, esta variável ajusta o risco de óbito das outras variáveis pela idade.

## 9 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, podemos concluir que:

- 1 Entre os receptores acoplados à proteína G (GPCR), estiveram associados significativamente, na análise univariada:
  - ✓ **PAR-1** com a variável clínico-demográfica estadiamento cN e a variável anátomo-patológica invasão de órgãos adjacentes;
  - ✓ **GRPR** com a variável clínico-demográfica estadiamento cN e as variáveis anátomo-patológicas grau de diferenciação e invasão perineural;
  - ✓ **EP2** com a variável anátomo-patológica invasão angiolinfática;
  - ✓ **EP4** com a variável clínico-demográfica estadiamento cN;
  - ✓ **CXCR4** com as variáveis anátomo-patológicas grau de diferenciação e invasão angiolinfática;
  - ✓ **CXCR4 e GPR54 nucleares** com variável anátomo-patológica coilocitose
  
- 2 Na análise univariada, estiveram associadas com comprometimento linfonodal:
  - ✓ As variáveis clínico-demográficas estadiamento clínico T e N

- ✓ As variáveis anátomo-patológicas grau de diferenciação, invasão angiolinfática, invasão perineural, invasão de corpo cavernoso e invasão de uretra.
  
- 3 No modelo multivariado estadiamento clínico N, invasão perineural e grau de diferenciação histológica foram fatores independentes de risco para comprometimento metastático dos linfonodos.
  
- 4 Os fatores adversos para óbito por câncer foram o estadiamento clínico N, a invasão perineural, o grau de diferenciação hitológica e o comprometimento linfonodal.
  
- 5 A expressão de PAR-1 em mais de 5% das células esteve associada com maior sobrevida global, na análise univariada.
  
- 6 Estadiamento clínico N, invasão perineural, grau de diferenciação histológica, postectomia e comprometimento linfonodal foram fatores independentes para o risco óbito por qualquer causa.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Almofti A, Uchida D, Begum NM, et al. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol** 2004; 25:65-71.

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.

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

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. **Nat Rev Cancer** 2004a; 4:540-50.

Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. **Semin Cancer Biol** 2004b; 14:171-9.

Bartholdi MF, Wu JM, Pu H, Troncoso P, Eden PA, Feldman RI. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. **Int J Cancer** 1998; 79: 82-90.

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

Behrens A, Sibilio M, David JP, et al. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. **Embo J** 2002; 21:1782-90.

Beisser PS, Lavreysen H, Bruggeman CA, Vink C. Chemokines and chemokine receptors encoded by cytomegaloviruses. **Curr Top Microbiol Immunol** 2008; 325: 221-42.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001; 91:2315-21.

Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin- derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. **J Cell Sci** 2004; 117:1319-28.

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cell** 2005; 120:303-13.

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.

Brouxhon S, Kyrkanides Stephanos, et al. Sequential down-regulation of E-cadherin with squamous cell carcinoma progression: loss of E-cadherin via a prostaglandin E2-EP2-dependent posttranslational mechanism. **Cancer Res** 2007; 67:7654-64.

Brown JR, DuBois RN. COX-2: A molecular target for colorectal cancer prevention. **J Clin Oncol** 2005; 23:2840-55.

Brumini R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-80**. Rio de Janeiro: Campanha Nacional de Combate ao Câncer; 1982.

Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood** 2006; 107:1761-7.

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

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

Campos RS, Lopes A, 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.

Cannon M. The KSHV and other human herpesviral G protein-coupled receptors. **Curr Top Microbiol Immunol** 2007; 312:137-56.

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

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. **Nat Med** 2004; 10:858-64.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:563-72.

Chang SH, Ai Y, Breyer RM, Lane TF, Hla T. The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2- mediated mammary hyperplasia. **Cancer Res** 2005; 65:4496-9.

Chave HS, Gough AC, Palmer K, Preston SR, Primrose JN. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. **Br J Cancer** 2000; 82:124-30.

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

Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. **Oncology** 2007; 73:340-5.

Coughlin SR. Thrombin signalling and protease activated receptors. **Nature** 2000; 407:258-64.

Couty JP, Gershengorn MC. Insights into the viral G protein-coupled receptor encoded by human herpesvirus type 8 (HHV-8). **Biol Cell** 2004; 96:349-54.

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

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.

Dadke D, Fryer BH, Golemis EA, Field J. Activation of p21-activated kinase 1-nuclear factor kappaB signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus protein-coupled receptor during cellular transformation. **Cancer Res** 2003; 63:8837-47.

de Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS Jr, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:78-81.

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.

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.

Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:79-94.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: A double-edge sword in tumorigenesis. **Nat Rev Cancer** 2003; 3: 859-868.

Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, et al. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. **Nat Med** 1998; 4:909-14.

Farhadieh RD, Smee R, Ow K, et al. Down-regulation of KAI1/CD82 protein expression in oral cancer correlates with reduced disease free survival and overall patient survival. **Cancer Lett** 2004; 213:91-8.

Ferrara C, Tessari G, Poletti A, et al. Ki-67 and c-jun expression in pancreatic cancer: a prognostic marker? **Oncol Rep** 1999; 6:1117-22.

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

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

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

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

Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertoson JF, Nicholson RI. Biological and clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. **Int J Cancer** 2000; 89:177-86.

Ghio P, Cappia S, Selvaggi G, et al. Prognostic role of protease-activated receptors 1 and 4 in resected stage IB non-small-cell lung cancer. **Clin Lung Cancer** 2006; 7:395-400.

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

Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. **J Immunol** 2000; 165:499-508.

Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. **Biochem J** 1996; 313:353-68.

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

Guimarães GC, da Cunha IW, Soares FA, Nonogaki S, Lopes A, Campos RSM. 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** 2006a; 449: 637-646.

Guimaraes 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** 2006b; 68:148-53.

Guimarães GC, Leal ML, Campos RS, Zequi Sde C, da Fonseca FP, da Cunha IW, Soares FA, Lopes A. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology** 2007; 70:137-42.

Guimarães GC, Cunha IW, Soares F, et al. Clinicopathological features, nodal metastasis and outcome according to WHO classification of penile squamous cell carcinoma: a report of 333 cases. **J Urol**, *in press*.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:11-21.

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

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; 52:111-6.

Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, et al. Pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. **J Biol Chemistry** 2007; 282: 29089-100.

Hansen-Petrik MB, McEntee MF, Jull B, Shi H, Zemel MB, Whelan J. Prostaglandin E(2) protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in Apc (Min/+) mice. **Cancer Res** 2002; 62:403-8.

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

Heasley LE. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer: review. **Oncogene** 2001; 20:1563-9.

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.

Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW, Pentecost BT. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. **Br J Cancer** 1999; 79:401-6.

Herr HW. Surgery of penile and urethral carcinoma. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED, editors. **Campbell's urology**. 6<sup>th</sup> 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.

Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. **Cancer Res** 1998; 58: 3761-4.

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

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

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

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

Hori A, Honda S, Asada M, et al. Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 286:958-63.

Huang Y, Li J, Karpatkin S. Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21 waf/cip1 and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway. **J Biol Chem** 2000; 275:6462-8.

Hull MA, Ko SC, Hawcroft G. Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer? **Mol Cancer Ther** 2004; 3:1031-9.

Hwang JH, Hwang JH, Chung HK, et al. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:408-16.

Ikeguchi M, Yamaguchi K-i, Kaibara N. Clinical significance of the loss of Kiss-1 and ofphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1379-83.

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.

Jäne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. **N Eng J Med** 2000; 342:1960-8.

Jiang X, Benovic JL, Wedegaertner PB. Plasma membrane and nuclear localization of G protein-coupled receptor Kinase 6A. **Mol Biol Cell** 2007; 18:2960-9.

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

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

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.

Kijima T, Maulik G, Ma PC, et al. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. **Cancer Res** 2002; 62: 6304-11

Konger RL, Billings SD, Thompson AB, et al. Immunolocalization of low-affinity prostaglandin E receptors, EP1 and EP2, in adult human epidermis. **J Invest Dermatol** 2005; 124:965-70.

Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **J Biol Chem** 2001; 276:34631-6.

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.

Kuo KT, Wang H-W, Chou T-Y, et al. Prognostic role of PGE2 receptor EP2 in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:352-60.

Lango MN, Dyer KF, Lui VW, Gooding WE, Gubish C, Siegfried JM, Grandis JR. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:375-83.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. **J Natl Cancer Inst** 1996; 88:1731-7.

Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. **Cancer Res** 1997; 57:2384-7.

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

Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. **Head Neck** 2002; 24:792-9.

Liu X, Carlisle DL, Swick MC, Gaither-Davis A, Grandis JR, Siegfried JM. Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. **Exp Cell Res** 2007; 313:1361-72.

Liu Y, Gilcrease MZ, Henderson Y, Yuan XH, Clayman GL, Chen Z. Expression of protease-activated receptor 1 in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Lett** 2001; 169:173-80.

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 Cirúrgica. **Acta Oncol** 1993; 13:2-3.

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

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.

Lui VW, Thomas SM, Zhang Q, et al. Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor. **Oncogene** 2003; 22:6183-93.

Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. **Cancer Res** 2006; 66:2923-7.

Malik FA, Sanders AJ, Jones AD, Mansel RE, Jiang WG. Transcriptional and translational modulation of KAI1 expression in ductal carcinoma of the breast and the prognostic significance. **Int J Mol Med** 2009; 23:273-8.

Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. **Trends Pharmacol Sci** 2001; 22:368-76.

Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. **Cancer Res** 1999; 59:1152-9.

Marot D, Bieche I, Aumas C, et al. High tumoral levels of Kiss1 and G-protein coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors. **End Rel Cancer** 2007; 14:691-702.

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

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.

Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. **Br J Pharmacol** 2007; 151:1143-53.

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

Miura K, Suzuki S, Tanita J, Shinkawa H, Satoh K, Tsuchida S. Correlated expression of glutathione S-transferase-pi and c-Jun or other oncogene products in human squamous cell carcinomas of the head and neck: relevance to relapse after radiation therapy. **Jpn J Cancer Res** 1997; 88:143-51.

Miyata Y, Kanda Shigeru, Matsuo T, et al. Relationship between prostaglandin E2 receptors and clinicopathologic features in human prostate cancer tissue. **Urology** 2006a; 68:1360-5.

Miyata Y, Ohba K, Kanda S, et al. Pathological function of prostaglandin E2 receptors in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. **Virchows Arch** 2006b; 448:822-9.

Möhle R, Schittenhelm M, Failenschmid C, et al. Functional response of leukaemic blast to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol** 2000; 110: 563-72.

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

Moore CAC, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and Arrestins. **Ann Rev Physiol** 2007; 69: 451-82.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, et al. AXOR12, a novel human G protein- coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. **J Biol Chem** 2001; 276:28969-75.

Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature** 2001; 410:50-6.

Murakami T, Maki W, Cardones AR, et al. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. **Cancer Res** 2002; 62: 7328-34.

Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. **N Engl J Med** 2001; 345:833-5.

Na I-K, Scheibenbogen C, Adam C, et al. Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. **Hum Pathol** 2008; 39:1751-5.

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

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

Navenot JM, Wang Z, Chopin M, Fujii N, Peiper SC. Kisspeptin-10-induced signaling of gpr54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. **Cancer Res** 2005; 65:10450-6.

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

Nierodzik ML, Kajumo F, Karpatkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and metastasis in vivo. **Cancer Res** 1992; 52:3267-72.

Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, et al. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. **Mol Carcinog** 1999; 26:119-29.

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

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell** 1996; 87:803-9.

Pan M-R, Hou M-F, Chang H-C, Hung W-C. Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells. **J Biol Chem** 2008; 283:11155-63.

Pansky A, De Weerth A, Fasler-Kan E, et al. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. **J Am Soc Nephrol** 2000; 11:1409-18.

Parkin DM, Whelam SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. Cancer incidence in five continents. Lyon: **IARC**; 1997. (IARC Scientific Publications, vol. VII, n<sup>o</sup> 143).

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

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

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

Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. **Oncogene** 2001; 20:1532-9.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors. **Nature Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:639-50.

Poetsch M, Schuart BJ, Schwesinger G, Kleist B, Protzel C. Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and nonmetastatic carcinomas. **Mod Pathol** 2007; 20:1069-77.

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].

Post GR, Brown JH. G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. **FASEB J** 1996; 10:741-9.

Prentice LM, Klausen C, Kalloger S, et al. Kisspeptin and GPR54 immunoreactivity in a cohort of 518 patients defines favourable prognosis and clear cell subtype in ovarian carcinoma. **BMC Medicine** 2007; 5: 33.

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.

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

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

Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14). **Clin Cancer Res** 2002; 8:1139-46.

Richard DE, Vouret-Craviari V, Pouyssegur J. Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. **Oncogene** 2001; 20:1556-62.

Riva C, Lavieille JP, Reyt E, Brambilla E, Lunardi J, Brabilla C. Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: implication in drug and radioresistance. **Eur J Cancer B Oral Oncol** 1995; 31B:384-91.

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

Ru-Cheng Kuo, Chiao-Ying Lin, Mark Yen-Ping Kuo. Prognostic role of c-JUN activation in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **J Form Med Assoc** 2005; 105:229-34.

Saisorn I, Lawrentschuk N, Leewansangtong S, Bolton DM. Fine-needle aspiration cytology predicts inguinal lymph node metastasis without antibiotic pretreatment in penile carcinoma. **Br J Urol 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, et al. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. **Int Braz J Urol** 2008; 34:467-76.

Scott N, Millward E, Cartwright EJ, Preston SR, Coletta PL. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumours. **J Clin Pathol** 2004; 57:189-92.

Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? **Cancer Res** 2001; 61:4961-5.

Sebesta JA, Young A, Bullock J, Moore KH, Azarow K, Sawin RS. Gastrin-releasing peptide: a potential growth factor expressed in human neuroblastoma tumors. **Curr Surg** 2001; 58:86-9.

Seethala RR, Gooding WE, Handler PN, et al. Immunohistochemical analysis of phosphotyrosine signal transducer and activator of transcription 3 and epidermal growth factor receptor autocrine signaling pathways in head and neck cancers and metastatic lymph nodes. **Clin Cancer Res** 2008; 14:1303-9. Erratum in: **Clin Cancer Res** 2008; 14:2247.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:721-32.

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

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, et al. Prospective validation of the association of local tumor stage and grades as predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal nodes. **J Urol** 2001; 165:1506-9.

Soufir N, Queille S, Liboutet M, et al. Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors. **Br J Dermatol** 2007; 156:448-53.

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

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.

Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. **Nature** 2003; 425:307-11.

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

Sufrin G, Huben R. Benignant and malignant lesions of the penis. In: Gillewnateer JY, editor. **Adult and pediatric urology**. 2<sup>nd</sup> 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.

Szepeshazi K, Schally AV, Nagy A, Halmos G. Inhibition of growth of experimental human and hamster pancreatic cancers in vivo by a targeted cytotoxic bombesin analog. **Pancreas** 2005; 31:275-82.

Taglia L, Matusiak D, Matkowskyj KA, Benya R. Gastrin-releasing peptide mediates its morphogenic properties in human colon cancer by upregulating intracellular adhesion protein-1 (ICAM-1) via focal adhesion kinase. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2007; 292:182-90.

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. **Cancer Res** 2002; 62:1832-7.

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.

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. **Endocrinology** 2005; 146:624-32.

Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. **Semin Thromb Hemost** 2004; 30:63-9.

Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, et al. Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant metastasis of human oral squamous cell carcinoma. **Mol Cancer Res** 2007; 5:685-94.

van Cleef KW, Smit MJ, Bruggeman CA, Vink C. Cytomegalovirus-encoded homologs of G protein-coupled receptors and chemokines. **J Clin Virol** 2006; 35:343-8.

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.

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

Velazquez EF, Cubilla AL. Penile squamous cell carcinoma: anatomic, pathologic and viral studies in Paraguay (1993-2007). **Anal Quant Cytol Histol** 2007; 29:185-98.

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, 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 sequences in penile carcinomas in Brazil. **Int J Cancer** 1986; 37:853-5.

Volm M, Koomagi R, Mattern J, Efferth T. Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1843-8.

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Cough SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell** 1991; 64:1057-68.

Wajsman Z, Merrin C, Baumgartner G, Jennings E. The clinical value of lymphangiography: are the nodes surrounding the obturator nerve visualized? **J Urol** 1977; 117:762-4.

Walz DA, Fenton JW. The role of thrombin in tumor cell metastasis. **Invasion Metastasis** 1994-1995; 14:303-8.

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.

Waterhouse J, Muir C, Correa P. Cancer incidence in five continents. **IARC Sci Publ** 1982; 4:750-1.

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

Wiener JS, Walther PJ. The association of oncogenic human papillomaviruses with urologic malignancy. **Surg Oncol Clin North Am** 1995; 4:257-76.

Wisdom R, Johnson RS, Moore C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. **EMBO J** 1999; 18:188-97.

Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Nelson KK, Walz DA, Diglio CA, Honn KV. Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased  $\alpha\beta_3$  expression on the cell surface. **Thrombin Res** 1992; 68:233-45.

Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Giarelli JJ, et al. thrombin increases the metastatic potential of tumor cells. **Int J Cancer** 1993; 54:793-800.

Woo SU, Bae JW, Kim CH, Lee JB, Koo BW. A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:281-5.

Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF- $\kappa$ B binding to the promoter as a consequence of In Ba -induced block of p65/p50 nuclear translocation. **J Biol Chem** 2001; 276:1164-72.

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.

Yokoyama Y, Sagara M, Sato S, Saito Y. Value of glutathione S-transferase pi and the oncogene products c-Jun, c-Fos, c-H-Ras, and c-Myc as a prognostic indicator in endometrial carcinomas. **Gynecol Oncol** 1998; 68:280-7.

Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. **Cell** 1986; 45: 711–719.

Young MJ, Reda DJ, Waters WB. Penile carcinoma: a twenty-five year experience. **Urology** 1991; 38:529-532.

Yu L, Shen Y, Li JK, Sun YH, Wang YC, Zhang JH. Expression of chemokine receptor CXCR4 in colorectal carcinoma and its relationship with clinicopathological parameters [abstracts]. **Zhonghua Wei Chang Wai De Za Zhi** 2008; 11:482-6.

Yowell CW, Daaka Y. G protein-coupled receptors provide survival signals in prostate cancer. **Clin Prostate Cancer** 2002; 1:177-81.

Yuen MF, Wu PC, Lai VC, Lau JY, Lau CL. Expression of c-Myc, c-Fos, and c-jun in hepatocellular carcinoma. **Cancer** 2001; 91:106–12.

Zain J, Hang Y, Feng X, Nierodzik ML, Li J, Karpatkin S. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. **Blood** 2000; 95: 3133-8.

Zhang JP, Lu W-G, Ye F, Chen H-Z, Zhou C-Y, Xie X. Study on CXCR4/SDF-1 $\alpha$  axis in lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma. **Int Gynecol Cancer** 2007; 17: 478-83.

Zhang X, Hunt JL, Landsittel DP, et al. Correlation of Protease-activated receptor-1 with differentiation markers in squamous cell carcinoma of the head and neck and its implication in lymph node metastasis. **Clin Can Res** 2004; 10: 8451-8459.

Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. **J Biol Chem** 2002; 277:49481-7.

Zhu T, Gobeil F, Vazquez-Tello A, et al. Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE<sub>2</sub>, PAF, and LPA<sub>1</sub> receptors. **Can J Physiol Pharmacol** 2006; 84:377-91.

Zuo J, Currin A, Griffin BD, et al. The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation. **Plos Pathog** 2009; 5:e1000255.

***ANEXOS***

---

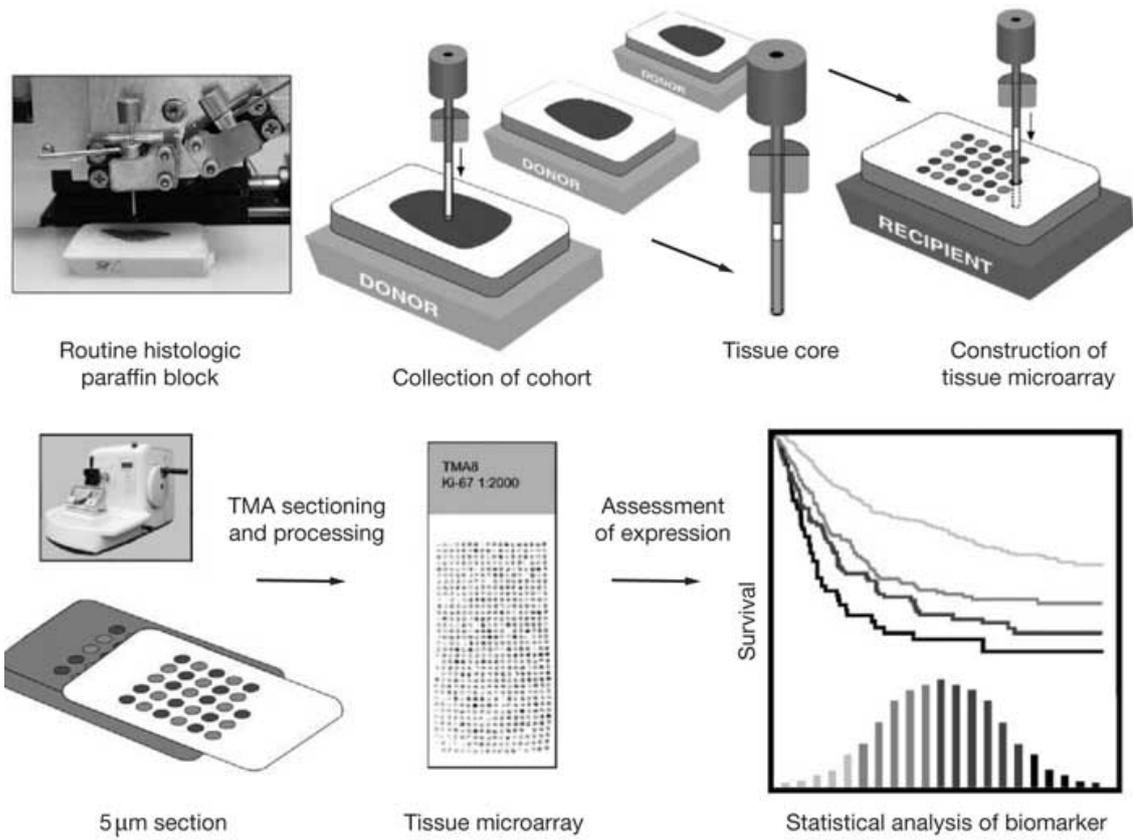


19. Data do esvaziamento: \_\_/\_\_/\_\_ ..... \_\_/\_\_/\_\_
20. Complicações relacionadas a amputação: (0) Não (1) Infecção .....|\_\_|  
(2) Deiscência (3) Estenose (4) hemorragia (9) Ign
21. Complicações relacionadas ao esvaziamento: .....|\_\_|  
(0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) hematoma (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 - Sistema de Classificação do Tumor de Pênis – TNM, UICC, 2002.

<b>T – Tumor Primário</b>
Tx – Tumor primário não avaliado
T0 – Sem evidência de tumor
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
<b>N – Linfonodos Regionais</b>
Nx – Linfonodos não avaliados
N0 – Sem metástases em linfonodos
N1 – Metástase única em linfonodo inguinal superficial
N2 – Metástases múltiplas ou bilaterais em linfonodos inguinais superficiais
N3 – Metástase em linfonodos inguinais profundos ou ilíacos
<b>M – Metástases à distância</b>
Mx – Metástases não avaliadas
M0 – Sem metástases à distância
M1 – Metástases à distância

### Anexo 3 - Construção do TMA



Giltane JM, Rimm DL. Construction and use of tissue microarrays for biomarker identification. **Nat Clin Practice Oncol** 2004; 1:104-11.

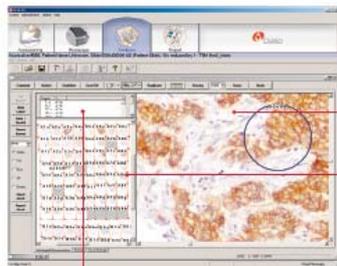
## Anexo 4 – Acis III: Especificações do Produto



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
<b>Software</b>	
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
<b>Additional Components</b>	
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	6018	45.47	67	
4 A c 0	793	13238	5.66	77	
5 A d 0	2305	10189	16.99	61	
6 A e 0	1833	9992	15.90	91	
7 B a 0	561	16199	3.35	64	
8 B b 0	5998	8362	41.77	104	
9 B c 0	11189	3232	77.68	115	
10 B d 0	4451	833	84.32	74	
11 B e 0	956	2258	29.75	66	
12 A a 1	695	22392	4.25	67	
13 A b 1	331	14126	2.29	69	

**Anexo 5** - Tabelas para as médias, medianas, desvios-padrão, valor mínimo e máximo e percentil para as intensidades e porcentagem da área marcada para os receptores acoplados à proteína G.

**Tabela A** – Intensidade (INT) e porcentagem de pontos marrons marcados (PORC) para os receptores PAR1, GRPR e GPR54 de 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

		PAR1INT	PAR1PORC	GRPRINT	GRPRPORC	GPR54INT	GPR54PORC
<b>N</b>	<b>Válidos</b>	229	229	237	237	238	238
	<b>Perdidos</b>	19	19	11	11	10	10
<b>Média</b>		86,32	55,28	94,42	59,00	108,05	61,19
<b>Mediana</b>		86,00	60,15	93,00	60,79	99,00	63,89
<b>Desvio Padrão</b>		4,37	37,24	7,66	20,40	22,01	24,16
<b>Mínimo</b>		79,00	0,00	82,00	1,76	80,00	0,25
<b>Máximo</b>		103,00	99,63	126,00	99,76	163,00	99,80
<b>Percentis</b>	25	83,00	16,51	89,00	48,78	90,75	44,41
	50	86,00	60,15	93,00	60,79	99,00	63,89
	75	89,00	92,62	99,00	74,51	124,00	80,63

**Legenda:** PAR1INT – intensidade de marcação de PAR1; PAR1PORC – porcentagem da área tumoral marcada para PAR1; GRPRINT – intensidade de marcação de GRPR; GRPRPORC – porcentagem da área tumoral marcada para GRPR; GPR54INT – intensidade de marcação para GPR54; GPR54PORC – porcentagem da área tumoral marcada para GPR54. Intensidades e porcentagens obtidos a partir do microscópio ACIS III.

**Tabela B** – Intensidade (INT) e porcentagem de pontos marrons marcados (PORC) para os receptores EP2, EP4 e CXCR4 de 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

		EP2INT	EP2PORC	EP4INT	EP4PORC	CXCR4I	CXCR4PORC
		NT					
<b>N</b>	<b>Válidos</b>	241	241	239	241	241	241
	<b>Perdidos</b>	7	7	9	7	7	7
<b>Média</b>		96,79	67,22	85,15	60,25	102,42	67,89
<b>Mediana</b>		96	72,47	84	68,39	100	72,23
<b>Desvio Padrão</b>		8,57	21,18	4,73	36,39	11,39	18,25
<b>Mínimo</b>		83	0,17	78	0	82	0,95
<b>Máximo</b>		125	99,07	110	99,84	145	98,92
<b>Percentis</b>	25	92	58,21	82	28,16	94	58,37
	50	96	72,46	84	68,39	100	72,23
	75	101	82,84	87	96,15	109	80,23

**Legenda:** EP2INT – intensidade de marcação de EP2; EP2PORC – porcentagem da área tumoral marcada para EP2; EP4INT – intensidade de marcação de EP4; EP4PORC – porcentagem da área tumoral marcada para EP4; CXCR4INT – intensidade de marcação para CXCR4; CXCR4PORC – porcentagem da área tumoral marcada para CXCR4. Intensidades e porcentagens obtidos a partir do microscópio ACIS III.

**Tabela C** - Intensidade (INT) de marcação nuclear para GPR54 e CXCR4 em 248 pacientes com carcinoma epidermóide usual de pênis.

		GPR54 nuclear INT	CXCR4 nuclear INT
<b>N</b>	<b>Válidos</b>	237	237
	<b>Perdidos</b>	11	11
<b>Média</b>		85,2	51,37
<b>Mediana</b>		107	0
<b>Desvio Padrão</b>		56,17	56,37
<b>Mínimo</b>		0	0
<b>Máximo</b>		167	142
<b>Percentis</b>	25	0	0
	50	107	0
	75	128	110

**Legenda:** GPR54 nuclear INT – intensidade de marcação nuclear para o GPR54; CXCR4 nuclear INT – intensidade de marcação nuclear para o CXCR4. Intensidades e porcentagens obtidos a partir do microscópio ACIS III.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)