

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA

CARLOS EDUARDO SCHIO FAY

" AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL NO
CARCINOMA DE PÊNIS "

Porto Alegre
2014

CARLOS EDUARDO SCHIO FAY

" AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL NO
CARCINOMA DE PÊNIS "

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul, como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Medicina e Ciências da Saúde – Área
de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Porto Alegre
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO

F282a Fay, Carlos Eduardo Schio

Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator tecidual no carcinoma de pênis / Carlos Eduardo Schio Fay. - Porto Alegre: PUCRS, 2014.

89 f.: il.; tab. Inclui artigo científico encaminhado para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal.

Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

1. CÂNCER DE PÊNIS. 2. FATOR TECIDUAL. 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 4. PROGNÓSTICO. 5. ESTUDO DE COORTE HISTÓRICA. I. Carvalhal, Gustavo Franco. II. Título.

CARLOS EDUARDO SCHIO FAY

" AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO FATOR TECIDUAL NO
CARCINOMA DE PÊNIS "

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul, como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Medicina e Ciências da Saúde – Área
de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovada em 24 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Salvador Gullo Neto - PUCRS

Prof. Dr. David Saitovictch - PUCRS

Prof. Dr. Oly Campos Corleta - UFRGS

Suplente: Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin - PUCRS

Porto Alegre
2014

DEDICATÓRIA

À minha mãe Liliana

Ao meu irmão Alexandre

À minha esposa Camila

Pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

Anatole France

Prêmio Nobel de Literatura em 1921

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo incentivo e carinho em todas as etapas de minha vida

Ao Hospital São Lucas da PUCRS, local de realização de minha especialização em Urologia, em Transplante Renal e Mestrado em Ciências Médicas

Ao Serviço de Urologia do Hospital São Lucas da PUCRS

Ao Dr. Gustavo Franco Carvalho, pelo incentivo à pesquisa e aprimoramento científico, pelo aprendizado em urologia e pela amizade

Ao Dr. Henrique Sarmento Barata, pelo exemplo de dedicação à Medicina, pela formação em Urologia e pelo apoio durante e após a residência

Aos colegas da Equipe de Transplante Renal do HSL pela amizade e apoio irrestritos

À CAPES pelo apoio essencial à realização do Mestrado

Aos funcionários do Serviço de Anatomia Patológica e da Pós-Graduação em Medicina

Ao técnico Tiago Giuliani Lopes pela auxílio na execução da imunohistoquímica

Ao Dr. Vinicius Duval da Silva pelo auxílio durante a realização do trabalho

RESUMO

Embasmamento: O aumento da expressão do fator tecidual (FT) foi correlacionado com pior prognóstico e sobrevida em várias neoplasias malignas. Em tumores urológicos, foi estudado na próstata, bexiga e rim. No presente estudo avaliamos a expressão imunistoquímica do FT em espécimes de câncer de pênis, correlacionando com fatores prognósticos e sobrevida.

Materiais e Métodos: Um total de 34 pacientes tratados com penectomia parcial ou total por câncer de pênis no Hospital São Lucas da PUCRS no período entre janeiro de 1998 a dezembro de 2012 foram incluídos no estudo. A expressão do FT foi determinada com metodologia quantitativa em amostras de tecido em parafina e correlacionada com idade, estadiamento clínico, estadiamento patológico, envolvimento linfonodal, grau de diferenciação histológico e sobrevida.

Resultados: A expressão do FT foi observada em 26 espécimes (76,4%). A média da expressão na amostra foi de $27,8 \mu\text{m}^2$ [IC 95% 20,0 – 35,6, DP 22,4]. Houve diferença significativa em relação a idade entre os grupos com expressão alta e baixa [57,6 anos (DP 9,9) contra 67,3 anos (DP 16,4), $p = 0,047$]. O seguimento médio foi de 28,3 meses (intervalo de 1 a 139,6 meses). Durante o acompanhamento houve 8 óbitos (76,5%), 4 em cada grupo, todos relacionados a neoplasia. Na análise multivariada, não houve correlação entre a expressão do FT e as variáveis em estudo.

Conclusões: O FT foi expresso na maioria das amostras de câncer de pênis. Não houve correlação entre nível de expressão do FT, fatores prognósticos e sobrevida.

Palavras-chave: câncer de pênis, fator tecidual, imunistoquímica, prognóstico.

ABSTRACT

Purpose: Increased expression of tissue factor (TF) was correlated with worse prognosis and survival in various malignant neoplasms. In urologic tumors, it was studied in prostate, bladder and kidney cancers. The present study evaluates the immunohistochemical expression of TF in human penile cancer, correlating it with prognostic factors and survival.

Materials and Methods: A total of 34 patients were treated by partial or total penectomy for penile carcinoma at our institution from January 1998 to December 2012. The immunohistochemical expression of TF was determined by a quantitative methodology in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples and correlated with age, clinical stage, pathologic stage, lymph node metastases, tumor grade and survival.

Results: Immunohistochemical expression of TF was observed in 26/34 (76.4%) specimens. The mean area of TF expression in the samples was $27.82 \mu\text{m}^2$ [95% CI 20.0 – 35.6, SD 22.4]. Mean age was significantly lower among patients with increased TF expression in comparison to those with lower TF expression [57.6 (SD 9,9) vs. 67.3 years (SD 16,4); $p = 0.047$]. Mean postoperative follow-up was 28.3 months (from 1 to 139.6 months). There were eight deaths (23.5%), four in each group, all related to the penile cancer. In multivariate analyses, there was no statistically significant correlation between TF expression and the study variables.

Conclusions: TF was expressed in most samples of penile cancers. There was no statistically significant correlation between TF expression, prognostic factors and survival.

Key Words: penile cancer, tissue factor, immunohistochemistry, prognosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação tumoral T TNM 2010	21
Figura 2. Fator Tecidual na cascata da coagulação	27
Figura 3. Sinalização intracelular via PAR2 e integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 3$	28
Figura 4. Regulação da expressão do FT no câncer	30
Figura 5. Imagem do software de captura do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS.	37
Figura 6. Distribuição da expressão do FT	41
Figura 7. Expressão do FT no câncer de pênis.	42
Figura 8. Curva de sobrevida global	46
Figura 9. Curva de Sobrevida Estratificada por Expressão do FT	47
Figura 10. Gráfico Forest - Análise Multivariada	48
Figura 11. Gráfico Forest - Análise Multivariada – Fatores Prognósticos no Câncer de Pênis	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento TNM 2010.....	20
Tabela 2. Grupos prognósticos TNM 2010	22
Tabela 3. Características dos pacientes segundo nível de expressão do FT	44
Tabela 4. Óbitos segundo nível de expressão do FT e estimativa de sobrevida KM	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AsTF - do Inglês, Alternatively-Splice Tissue Factor

CTGF- do Inglês, Connective Tissue Growth Factor

CXCL-1- do Inglês, Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1

Cyr61- do Inglês, Cysteine-Rich Angiogenic Inducer, 61

DMV – Densidade Micro Vascular

EGF - do Inglês, Epidermal Growth Factor

EGFR - do Inglês, Epidermal Growth Factor Receptor

EGR-1 - do Inglês, Early Growth Response Protein-1

FAK - do Inglês, Focal Adhesion Kinases

FGF - do Inglês, Fibroblast Growth Factor

FT - Fator Tecidual

FT-A - Fator Tecidual-A

FVIIa - Fator VII ativado

GM-CSF - do Inglês, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HGFR - do Inglês, Hepatocyte Growth Factor Receptor

HPV - do Inglês, Human Papillomavirus

HR - do Inglês, Hazard Ratio

IIEF - do Inglês, International Index of Erectile Function

IL-1 – Interleucina 1

IL-8 - Interleucina 8

JNK - do Inglês, c-Jun N-terminal kinases

KM – Kaplan-Meier

KDa – Kilodalton

M-CSF - do Inglês, Macrophage Colony-Stimulating Factor

MAP - do Inglês, Mitogen-Activated Protein

MAPK – do Inglês, Mitogen-Activated Protein Kinase

PAR2 – do Inglês, Protease Activated Receptor 2 (PAR2)

PDGF - do Inglês, Platelet-Derived Growth Factor

PI3 - phosphatidylinositol-3

PSA - do Inglês, Prostate-specific antigen

PTEN - do Inglês, Phosphatase and Tensin Homolog

RB - do Inglês, Retinoblastoma protein

SBU - Sociedade Brasileira de Urologia

SEER - do Inglês, Surveillance, Epidemiology, and End Results

TEP - Tromboembolismo Pulmonar

TF - do Inglês, Tissue Factor

TF-A do Inglês, Tissue Factor-A

TGF - do Inglês, Transforming Growth Factor

TNF- α - do Inglês, Tumor Necrosis Factor α

TNM- do Inglês, Tumor, Node, Metastases

TVP - Trombose Venosa Profunda

VEGF - do Inglês, Vascular Endothelial Growth Factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer de Pênis	15
1.2 Fator Tecidual	26
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Principal	34
3.2 Objetivos Secundários	34
4 PACIENTES E MÉTODOS	35
4.1 Delineamento, População e Amostra	35
4.2 Critérios de Inclusão	35
4.3 Critérios de Exclusão	36
4.4 Variáveis do Estudo	36
4.4.1 Variável Principal	36
4.4.2 Variáveis Secundárias	36
4.5 Análise Digital das Imagens	36
4.6 Análise da Expressão do Fator Tecidual	38
4.7 Imunoistoquímica	38
4.8 Análise Estatística	39
4.9 Ética	39
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	57
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	64
Anexo A Aprovação da Comissão Científica da FAMED e HSL-PUCRS	65
Anexo B Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66
Anexo C Termo de Compromisso para Utilização de Dados.....	67
Anexo D Protocolo de Coleta de Dados.....	68
Anexo E Artigo Científico	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Pênis

O câncer de pênis é considerado uma neoplasia rara em países desenvolvidos e sua ocorrência está quase sempre relacionada às más condições socioeconômicas. (1) Em países europeus e no Canadá apresenta frequência de 0,5 a 1,3 casos para cada 100000 habitantes.(2) Nos EUA o câncer de pênis é responsável por 0,3 a 0,8% de todos os canceres em homens e 2% dos canceres genitais do homem, com mortalidade em torno de 1 a 2%. (3) (4) Em 2013, são estimados 1570 casos novos nos EUA, com 310 mortes câncer específicas. (5)

Em alguns países da América do Sul, África e Ásia, incluindo Uganda, China e Índia, constitui um grave problema de saúde com incidências entre 10 a 20%. (3, 6, 7) No Brasil corresponde a apenas 2% de todos os tipos de tumores malignos em homens. Nas regiões Norte e Nordeste a incidência é cerca de 5 vezes maior em relação ao Sul e Sudeste; em alguns locais a prevalência do câncer de pênis chega a superar os tumores de próstata e bexiga. (8) (9) Alguns estudos sugeriram que a incidência do câncer de pênis tem diminuído em alguns países, incluindo Finlândia, Dinamarca, Estados Unidos, Índia e outros países asiáticos (10, 11). As razões da redução são incertas mas parece ser relacionada em parte com o aumento da atenção a higiene pessoal.

Acomete principalmente homens de classe social e nível de instrução baixos, com pico de incidência entre a sexta e sétima décadas.(12, 13) Em estudo utilizando os dados do Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER), com cobertura de 83% da população americana, de 1998 a 2003 um total de 4967 casos de câncer de pênis foram diagnosticados, com uma taxa anual ajustada de 0,81 por 100000 habitantes. Comparativamente, a incidência foi semelhante entre negros e brancos, mas foi aproximadamente duas vezes menor em asiáticos. O risco foi 43% maior em homens de condados com 20% ou mais da população em níveis de pobreza, em relação a homens vivendo em condados com menos de 10% no nível

de pobreza. A incidência também foi maior em homens vivendo em condados com menos de 75% da população com segundo grau completo. (14)

A incidência do carcinoma de pênis varia de acordo com a prática de circuncisão, higiene pessoal, fimose, número de parceiros sexuais, infecção por HPV e tabagismo. (15) A circuncisão neonatal diminui consideravelmente a ocorrência do carcinoma de pênis. O benefício parece não ser presente quando a circuncisão é realizada em adultos. (16) A circuncisão tem mostrado benefício em redução de infecção por HIV, mas não para algumas DSTs, com herpes tipo 2, sífilis ou gonorreia. (17) Além disso, pode não ser tão importante na redução da incidência do câncer de pênis em países onde o boa higiene é praticada. (10) A circuncisão neonatal de rotina para prevenção de câncer de pênis ainda é motivo de controvérsia e debate; recentemente a Associação Americana de Pediatria publicou revisão favorável a realização da circuncisão em neonatos pois os benefícios de redução de neoplasia de pênis, infecção com HIV e HPV superam os riscos. (18) O câncer de pênis é raro em comunidades religiosas em que a circuncisão é realizada no período neonatal ou pré-puberal, como muçulmanos, judeus e os Igbo da Nigéria, comparados com os que rotineiramente não são submetidos, como os hindus. (3) (6)

O efeito irritativo crônico do esmegma tem sido proposto como agente etiológico. O acúmulo de esmegma abaixo do prepúcio aumenta a incidência de patologias inflamatórias como a balanite crônica e a balanite xerótica obliterante, além predispor à fibrose do prepúcio e ocorrência de fimose em pacientes com exposição adequada da glândula, com perpetuação do ciclo. A fimose está presente em cerca de 25 a 75% dos pacientes.

A infecção por certos subtipos de HPV também tem sido correlacionada com o câncer de pênis. História prévia de condiloma aumenta o risco em 5 a 6 vezes. O HPV foi identificado em 70 a 100% das neoplasias intra-epiteliais e em 40-50% dos casos de carcinoma de pênis invasivo. (19) Mais de 25 tipos de HPV infectam a região genital. HPV 6 e 11 são mais comumente associados a lesões não

displásicas como verrugas genitais. Em contraste, HPV 16, 18, 31 e 33 são associados com carcinoma in-situ e carcinomas invasivos. (20) HPV 16 parece ser mais frequentemente detectado em tumores primários e também é detectado em doenças metastáticas. (20) Embora provavelmente seja um fator etiológico no desenvolvimento do câncer de pênis, sua presença não é invariável, indicando que fatores adicionais podem estar envolvidos. (21) O genoma do HPV codifica a oncoproteína E6, que se complexa com a proteína de supressão tumoral TP53, e oncoproteína E7, que liga-se a proteína do retinoblastoma (RB) afetando a regulação do ciclo celular. (22)

Alguns estudos mostraram associação significativa entre exposição ao cigarro e desenvolvimento de câncer de pênis. Trabalho de Harish et al. identificou que todos os tipos de exposição ao tabaco, não só o cigarro, foram significativamente e independentemente relacionados ao câncer de pênis na regressão multivariada. (23)

A exposição à radiação ultravioleta, com ou sem uso de psoralenos (PUVA), aumenta o risco consideravelmente, e é dose relacionada. Pacientes com líquen escleroso (também conhecido como balanite xerótica obliterante) têm risco de desenvolver câncer de pênis ao longo da vida de 3 a 9%. (24) Número elevado de parceiros sexuais e relação sexual com animais também têm sido correlacionados com o câncer de pênis. (25)

Usualmente começa como uma pequena lesão que gradualmente estende-se para envolver toda a glândula, corpo e base do pênis. A lesão pode ser papilar e exofítica ou plana e ulcerativa. As taxas de crescimento são similares, mas o tumor plano e ulcerativo tem tendência a metástase nodal mais precoce e é associado a pior sobrevida em 5 anos. (21) Fimose pode obscurecer a lesão e permitir a progressão silenciosa. Eventualmente ocorre odor fétido no prepúcio e corrimento com ou sem sangramento associado. Ocorre mais comumente na glândula (48%), prepúcio (21%), glândula e prepúcio (9%), sulco coronal (6%) e corpo do pênis (<2%).

(1) Retenção urinária e fístula uretral secundária a invasão são sinais raros de apresentação.

Pacientes com câncer de pênis, mais frequentemente que em outros tipos de câncer, demoram a procurar serviço de atenção médica. 15 a 50% dos pacientes demoram mais de um ano. (26) Em 2012, Skeppner et al. publicaram estudo com 59 pacientes consecutivos tratados para câncer de pênis de 2005 a 2009 no Orebro University Hospital, em Orebro, Suécia. 65% dos pacientes demoraram mais de 6 meses para procurar atendimento médico. Morar com parceira estável não alterou esse atraso. A causa mais comum foi o sentimento de vergonha por sintomas localizados na área sexual. Em 9 pacientes houve diferença de 3 meses entre a primeira consulta ao médico e o diagnóstico de câncer. (27)

Cerca de 95% dos tumores malignos do pênis são carcinomas epidermóides. Outras neoplasias, como os melanomas, carcinoma basocelular, os sarcomas e os tumores metastáticos para o pênis são muito raras, e originadas principalmente em bexiga, próstata e cólon. O carcinoma verrucoso é uma variante clínica do carcinoma epidermóide de pênis com comportamento clínico menos agressivo. (28, 29) Histologicamente esses tumores apresentam características diferentes de acordo com o grau de diferenciação. Na epiderme, carcinomas epidermóides de pênis de baixo grau (I-II) mostram hiperqueratose e papilomatose, com células escamosas pouco atípicas, mostrando pontes intercelulares proeminentes, com poucas figuras mitóticas e núcleos pleomórficos aumentados com um ou mais nucléolos proeminentes. Neoplasias menos diferenciadas (III-IV) mostram pouca ou nenhuma queratinização, maior atipia nuclear e atividade mitótica, e maior invasão com áreas de necrose. Na derme, um infiltrado linfocítico ou inflamatório pode estar presente. (3) Existe correlação entre o tipo histológico e comportamento biológico do tumor. Tumores grau I e III apresentam metástases inguinais em 15 e 75% dos casos respectivamente. (21)

O risco de envolvimento linfonodal varia de 0 a 48% em tumores G1, de 32 a 79% em G2, e 47 a 100% em G3. (21, 30) No estudo de Horenblas et al. houve diferença estatística na sobrevida em 5 anos entre pacientes com tumores G1

(79%) e pacientes com tumores G3 (47%). (31) Tumores bem diferenciados costumam ocorrer em pacientes mais velhos e usualmente associados com líquen escleroso preexistente e tem risco baixo de disseminação metastática. (3, 21)

Marcadores moleculares não são utilizados na prática clínica, embora a expressão de p53, Ki-67 e E-caderina tenham correlação com metástase linfonodal. (29, 32) Em estudo de Lopes et al., a expressão de p53 foi um preditor independente de metástase linfonodal, com sobrevidas em 5 e 10 anos significativamente menores em pacientes p53 positivos. (33) Campos et al. reportaram incidência significativamente maior de metástase linfonodal em pacientes com níveis baixos de e-caderina em relação a pacientes com níveis altos de e-caderina. (34) Protzel et al. reportaram 100% de metástases linfonodais em pacientes com expressão de Ki-67 maior que 60%, contra 0% em pacientes com expressão menor que 15%. (35)

A avaliação clínica deve mostrar localização, tamanho, bordas, consistência, fixação, extensão da neoplasia primária e invasão de outras estruturas, presença de dermatoses preexistentes e presença de linfonodos aumentados. Inúmeras lesões devem ser consideradas no diagnóstico diferencial, incluindo condiloma, tumor de Buschke-Löwenstein, balanite xerótica obliterante e doenças infecciosas (dentre elas: tuberculose, linfogranuloma venéreo, herpes, sífilis). Estudos de imagem peniana ocasionalmente podem ser úteis. A confirmação histológica é necessária e é realizada por uma biópsia incisional ou excisional, para determinar a extensão anatômica da invasão, grau tumoral e presença de invasão linfovascular. Quando não é possível o exame de palpação inguinal, por obesidade ou cirurgia prévia, ou quando alguma linfadenopatia é palpável, a tomografia computadorizada é útil para complementação diagnóstica. Rastreamento para metástases à distância é realizado quando clinicamente apropriado.

O estadiamento do câncer de pênis é mais comumente realizado utilizando-se a sétima edição do TNM da American Joint Committee (AJCC).

Tabela 1. Estadiamento TNM 2010

T-Tumor primário

TX Tumor primário não pode ser avaliado

T0 Sem evidência de tumor primário

Tis Carcinoma *in situ*

Ta Carcinoma verrucoso não invasivo,

T1 Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial

T1a: sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado) (Grau 1-2)

T1b: com invasão linfovascular ou pouco diferenciado/indiferenciado (Grau 3-4)

T2 Tumor invade o corpo esponjoso/corpo cavernoso

T3 Tumor invade a uretra

T4 Tumor invade outras estruturas adjacentes

N- Linfonodos regionais (Clínico e Patológico)

cNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

cN0 Sem linfonodos inguinais aumentados visíveis ou palpáveis

cN1 Linfonodo inguinal palpável móvel unilateral

cN2 Linfonodos inguinais palpáveis móveis múltiplos ou bilaterais

cN3 Massa de linfonodos inguinais fixa ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral

pNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

pN0 Ausência de metástase em linfonodos regionais

pN1 Metástase intranodal em um único linfonodo inguinal

pN2 Metástases em múltiplos linfonodos inguinais ou em linfonodos inguinais bilaterais

pN3 Metástases em linfonodo(s) pélvico(s), unilaterais ou bilaterais, ou extensão extranodal de metástases em linfonodos regionais

M-Metástase à distância

Mx Metástases à distância não pode ser avaliada

M0 Sem metástases à distância

M1 Metástases à distância

G- Graduação histopatológica

Gx O grau de diferenciação não pode ser avaliado

G1 Bem diferenciado

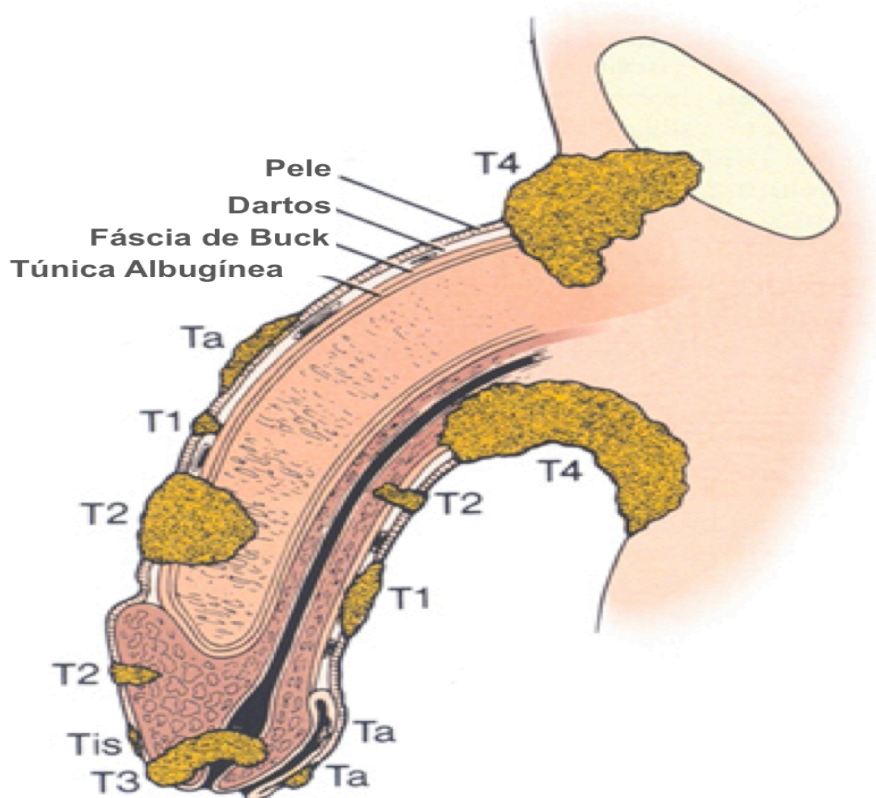
G2 Moderadamente diferenciado

G3 Pouco diferenciado

G4 Indiferenciado

Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010

Figura 1. Classificação Tumoral T TNM 2010



Fonte: Adaptado de Institute of the Study of Urologic Diseases, Salônica, Grécia

Algumas mudanças ocorreram em relação a sexta edição: T1 foi subdividido em T1a e T1b baseado na presença ou ausência de invasão linfovascular ou indiferenciação tumoral; a categoria T3 foi limitada a invasão uretral e a invasão prostática agora é considerada T4; estadiamento linfonodal é dividido agora em clínico e patológico; a distinção entre linfonodos inguinais superficiais e profundos não existe mais; o grupo T1bN0M0 foi colocado no estágio II, assim como os grupos T2N0M0 e T3N0M0. (36)

Tabela 2. Grupos Prognósticos TNM 2010

Estágio 0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
Estágio I	T1a	N0	M0
Estágio II	T1b	N0	M0
	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Estágio IIIa	T1-3	N1	M0
Estágio IIIb	T1-3	N2	M0
Estágio IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010

A escolha do tratamento depende do tamanho do tumor, sua posição na glândula ou no corpo do pênis e achados patológicos. Biópsia excisional com margens em lesões pequenas e superficiais podem algumas vezes prover o diagnóstico e a cura ao mesmo tempo.

A amputação cirúrgica do pênis, parcial ou total, com ressecção completa do tumor primário e margens apropriadas continua como tratamento oncológico padrão, com taxas de recorrência entre 0 e 8%. (31) O impacto na qualidade de vida dos pacientes é grande, já que 55% dos pacientes tem menos de 60 anos e 30% têm menos de 55 anos. (37) Alguns tumores com achados histológicos favoráveis (tumores Tis, Ta, T1 baixo Grau) podem ser tratados com terapia preservadora do órgão, que tem por objetivo manter tecido glandar quando possível e manter comprimento do pênis quando não é possível preservar a glândula. (38) Tumores in situ podem ser tratados com excisão local simples, circuncisão para lesões limitadas ao prepúcio, e microcirurgia de Mohs. Outras modalidades de tratamento incluindo crioterapia, 5-FU tópico, CO₂ ou Nd:YAG laser, curetagem combinada com cauterização, mas com riscos aumentados de recorrência (27% a 5%). (21, 38)

Tumores T1 menores que 2cm podem ser tratados com sucesso com excisão cirúrgica com margem para prevenir recorrência local em tumores da glândula, ou com circuncisão ampla em lesões da porção distal do prepúcio. Tumores T1 de baixo estágio, especialmente em pacientes jovens, podem ser manejados para preservar função sexual com radioterapia externa ou braquiterapia após circuncisão pré tratamento. (21)

Tumores T1 maiores de 2cm e tumores T2 na glândula ou terço distal do pênis são tratados com penectomia parcial, com excisão de 1 a 2,5 cm de tecido normal para diminuir recorrência. Nesses pacientes, se não houver metástase inguinal, a taxa de cura é excelente e a sobrevida a longo prazo pode ser de 70-80% com 6% ou menos de recorrência. (39) Tumores T2 proximais e T3-T4 devem ser tratados com penectomia total para garantir margens livres de tumor.

A rota de disseminação mais precoce é através de metástase para os linfonodos femorais e ilíacos. Os linfáticos do prepúcio formam uma rede que se conecta aos linfáticos da pele do corpo do pênis para drenar aos linfonodos inguinais superficiais (externos à fáscia lata). Os linfáticos da glândula conectam-se com os linfáticos dos corpos cavernosos e na base do pênis drenam para os linfonodos superficiais. Os linfonodos inguinais superficiais drenam para os linfonodos inguinais profundos (internamente à fáscia lata) e a partir daí para os linfonodos pélvicos (ilíacos externos e internos e obturadores). Metástases clinicamente detectáveis para pulmão, fígado, osso ou cérebro são incomuns; ocorrem tarde no curso da doença e raramente ocorrem em pacientes sem metástase linfonodal. Caracteriza-se por ter curso progressivo, causando a morte na maioria dos pacientes não tratados dentro de 2 anos. (21)

Um curso de antibióticos deve ser administrado antes da dissecação superficial já que apenas cerca de 50% dos pacientes com linfonodos aumentados apresentam evidências de metástases e a linfadenectomia traz um significativo risco de morbidade. (40) Metástase oculta pode acontecer em 12 a 24% dos pacientes sem

linfonodos palpáveis. A taxa de sobrevida em 5 anos varia de 75 a 93% em pacientes com doença cN0, 40-70% em pacientes cN1, 33-50% em pacientes cN2, e de 20-34% nos pacientes cN3. (41) O prognóstico de pacientes com linfonodos positivos varia de acordo com certos fatores, como número de linfonodos positivos, a presença de extensão linfonodal uni ou bilateral, envolvimento de linfonodos pélvicos, presença de envolvimento capsular do linfonodo. (42) Em trabalho de Ravi et al. a sobrevida câncer específica foi de 77% em pacientes com 1 a 3 linfonodos acometidos, 8,4% em pacientes com 4-5 linfonodos acometidos e 0% nos pacientes com mais de 5 linfonodos acometidos. A taxa estimada de sobrevida em 3 anos foi de 12,5%. (43)

Biópsia de linfonodo sentinela tem sido utilizado para avaliar o status linfonodal de pacientes sem linfadenopatia ao exame clínico (cN0). Tc 99m nanocolóide é injetado no dia anterior à cirurgia; antes do procedimento, azul patente é injetado e um probe de detecção gama é utilizado no intraoperatório. A linfadenectomia inguinal completa é realizada apenas nos pacientes com linfonodo positivo. As taxas de falso negativos e de complicações são atualmente de 4,8% e 5,7%, respectivamente. Esta técnica é reprodutível atualmente com pequena curva de aprendizado. (44)

Linfadenectomia ilioinguinal profilática pode trazer sobrevida de 88% em 5 anos em oposição a 42% em pacientes em que a dissecação é postergada até os linfonodos serem clinicamente palpáveis, mas pode resultar em complicações maiores em 24-87% dos pacientes e óbito em 3%. (21, 29) Dentre as complicações estão flebite, tromboembolismo pulmonar, infecção de ferida operatória, necrose de pele, seroma e linfedema do escroto e membros inferiores. (40) Quimioterapia adjuvante deve ser considerada nos pacientes com mais de dois linfonodos positivos, extensão extra nodal, ou metástases pélvicas. (45) O prognóstico para o carcinoma metastático de pênis é muito ruim tanto com cirurgia ou quimioterapia isolados. Recentemente Pagliaro et al. demonstraram resultados promissores em um estudo prospectivo com terapia multimodal com uso de quimioterapia com paclitaxel,

ifosfamida e cisplatina adjuvantes a cirurgia, em pacientes com massas linfonodais N2 ou N3 e sem metástases sistêmicas (46)

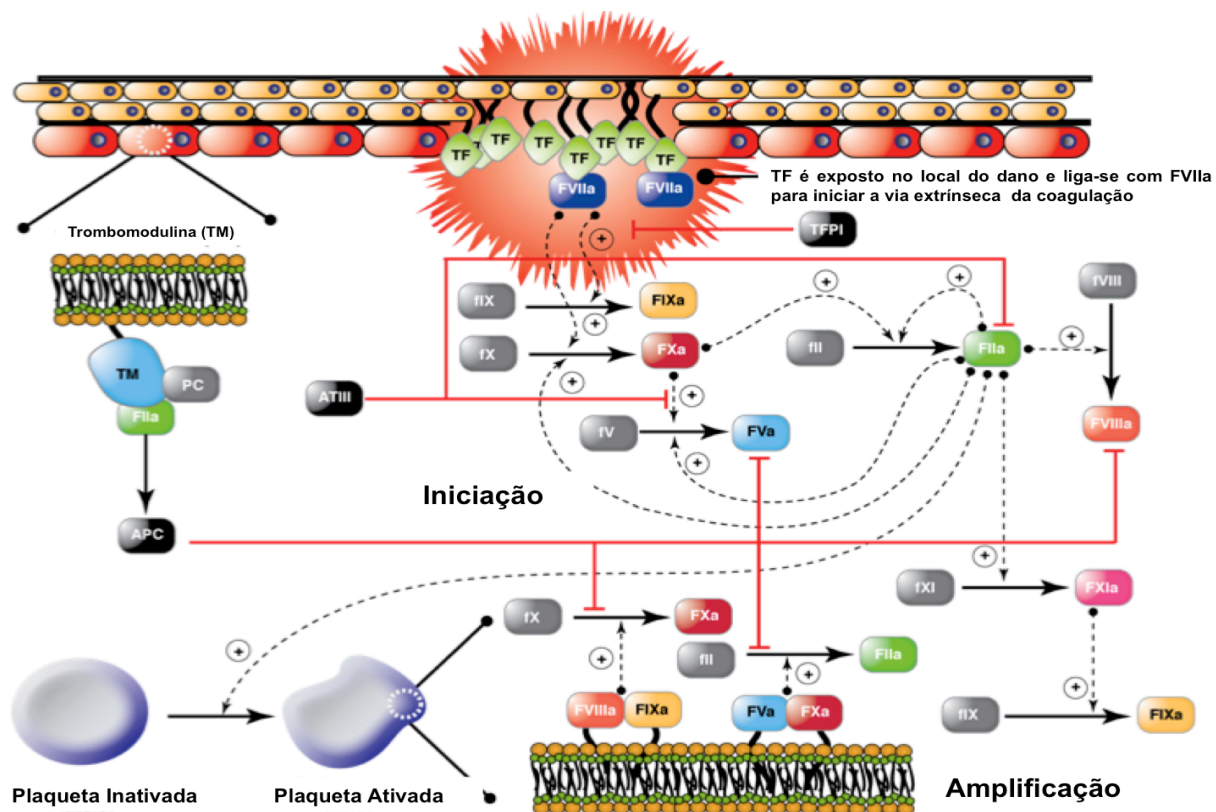
1.2 Fator Tecidual

A associação entre a coagulação e o câncer é estudada desde 1865, quando Trousseau observou maior incidência de trombose em pacientes com câncer gastrointestinal. Inicialmente observada em pacientes com câncer de pâncreas, cólon e estômago, a síndrome de Trousseau foi descrita posteriormente em pacientes com neoplasias de próstata, ovário e pulmão. (47) Alterações na coagulação são encontradas em até 90% dos pacientes com câncer e manifestam-se mais severamente como TVP nas extremidades e TEP. (48) Evidências histopatológicas de depósitos trombóticos incluindo coágulos de fibrina, plaquetas e células inflamatórias dentro e ao redor da massa tumoral dão apoio patológico a esta teoria. Em pacientes com câncer de pâncreas a taxa de tromboembolismo venoso varia de 4,5 a 57%; em pacientes com glioblastoma multiforme cerca de 30% no seu último ano de vida. (49) (50) O risco de trombose nesses pacientes aumenta com os tratamentos para a neoplasia, como a cirurgia para a ressecção tumoral e a quimioterapia. A superexpressão do fator tecidual, especialmente pelas células tumorais, parece ter papel fundamental na etiologia desse fenômeno e também no crescimento, invasão e disseminação tumorais. (51)

Fator tecidual (FT), ou tromboplastina, é uma glicoproteína transmembrana de 47 KDa formada por um longo domínio extracelular que serve como receptor para o fator VIIa, com 219 aminoácidos; um curto domínio transmembrana, com 23 aminoácidos; e uma cauda intracitoplasmática com resíduos de purina suscetíveis a fosforilação quando ativadas, com 21 aminoácidos. (52) É classificado como membro da família de receptores de citocinas tipo II, que inclui os receptores do interferon- α , interferon- σ e interleucina-10.

O FT tem papel importante na cascata da coagulação servindo como cofator para o Fator VII ativado (FVIIa). O complexo resultante FT-FVIIa ativa os fatores IX e X, que continuam a cascata com ativação de outros fatores, e estes processos levam ao final à conversão de fibrinogênio a fibrina e à formação do coágulo. (53)

Figura 2. Fator Tecidual na cascata da coagulação.

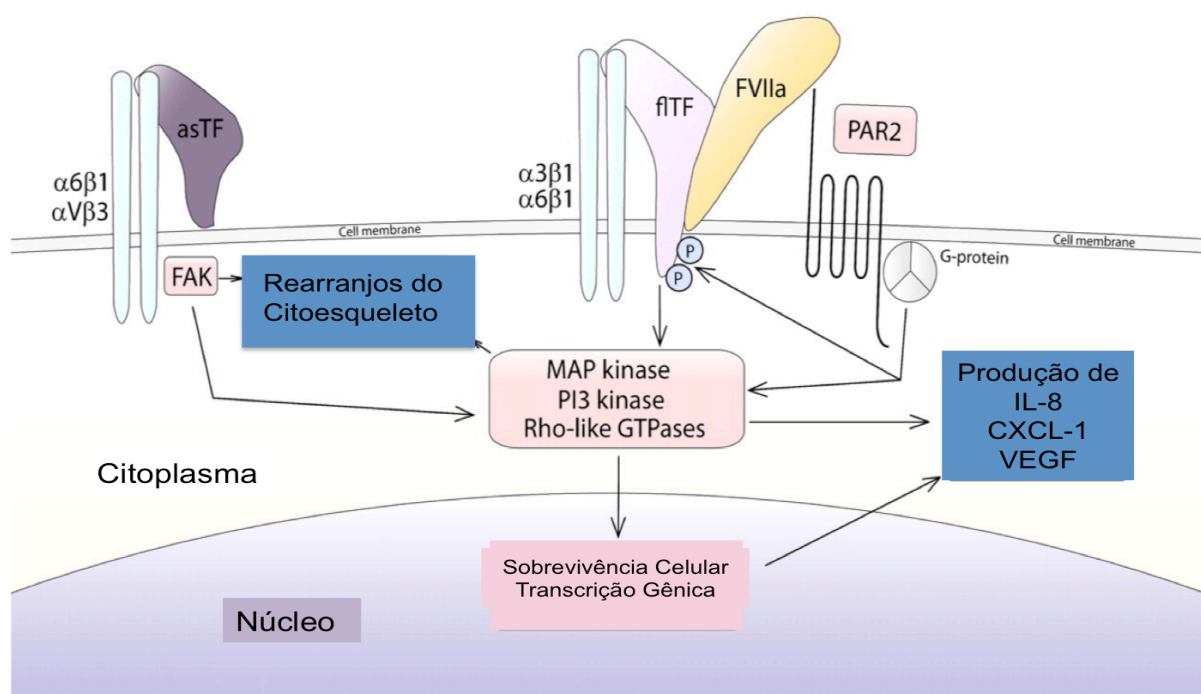


Fonte: Luan et al. Mol Biosyst. 2010 Nov;6(11):2272-86.

Existem funções alternativas do fator tecidual, e que são independentes da formação de fibrina. A ligação do FVIIa com o FT resulta em uma série de eventos sinalizadores que regulam uma ampla gama de respostas celulares necessárias para a célula responder adequadamente ao seu ambiente local, como transcrição gênica, sobrevivência celular e alterações no citoesqueleto. (52) A sinalização intracelular acontece tipicamente via PAR2. Ocorre ativação de proteínas da família MAPK, p44/42, p38, JNK, PI3 quinase e Src-like quinases. A ativação da MAPK e da PI3 quinase contribuem para transcrição pró-maligna e estimulam a síntese proteica oncogênica. (54) Uma série de fatores pró-angiogênicos são estimulados pela ativação da via PAR2, como o VEGF, Cyr61, VEGF-C, CTGF, CXCL1 e IL-8; assim como moduladores imunológicos, como o GM-CSF e o M-CSF. (55) O FT pode gerar efeitos celulares não hemostáticos independente da PAR2, através da ligação com a integrina, pela sua isoforma FTas. O FT é codificado por 6 éxons, enquanto o FTas é

codificado por 5 éxons pela falta do 5º éxon. A fusão do éxon 4 e 6 altera a conformação e leva a formação de uma terminação C-terminal única, que torna o FT-as solúvel e detectável no plasma. (56) O papel dessa isoforma na cascata da coagulação tem sido debatida desde sua descoberta, com aumento de evidências suportando sua relação com processos relacionados ao câncer. (57)

Figura 3. Sinalização intracelular via PAR2 e integrinas $\alpha6\beta1$ e $\alpha6\beta3$



Fonte: van den Berg et al. Blood. 2012 Jan 26;119(4):924-32

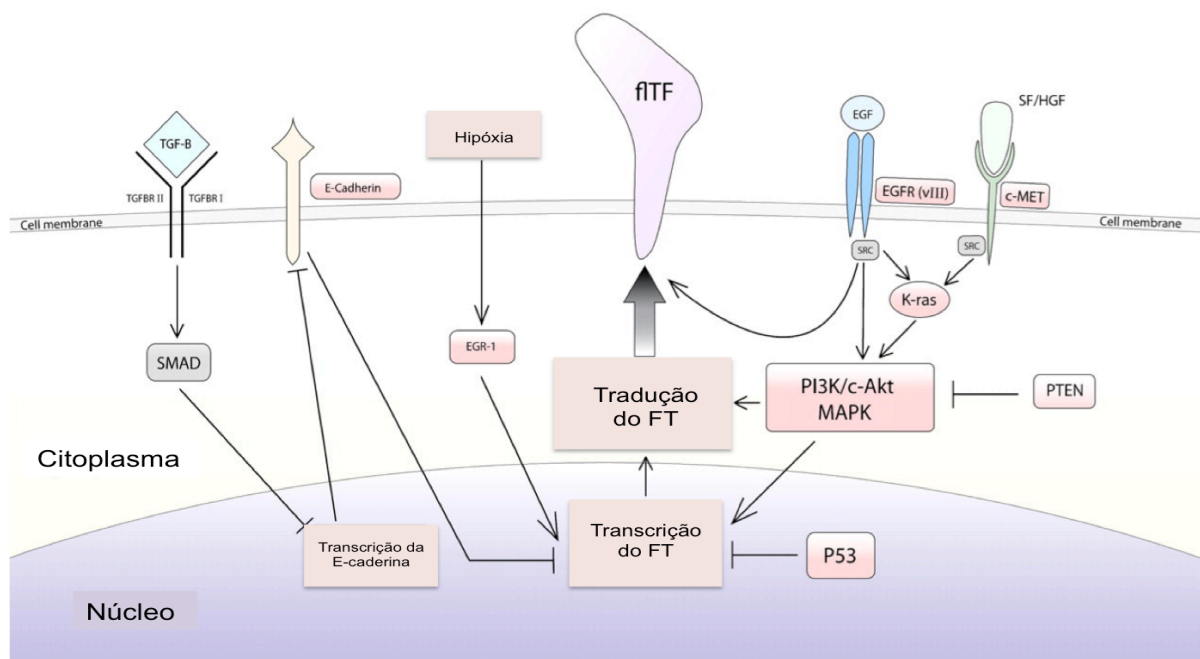
A expressão constitutiva do FT ou de seu mRNA é confinada aos fibroblastos estromais na adventícia dos vasos e na cápsula de órgãos, nas células epiteliais da pele e mucosas, nas células estromais do endométrio e nos astrócitos no cérebro. Não foi detectado FT nas células intravasculares, como por exemplo em endotélio íntegro e células sanguíneas periféricas. Isto sugere que o FT forma um envelope hemostático, com desencadeamento de uma barreira hemostática frente a ruptura da integridade vascular ou tissular.

A expressão do FT pode ser induzida por uma variedade de agentes, incluindo citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- α), mitógenos (FGF, PDGF, VEGF, EGF, insulina, TGF- β 1, VEGF, angiotensina II, α -trombina), hormônios, endotoxinas, infecções virais, complexos imunes, lipoproteínas modificadas, hipóxia e injúria mecânica. Notavelmente, a expressão de FT ocorre em células de linhagem monocitária, células musculares lisas vasculares, células endoteliais e células tumorais logo cedo após a estimulação, resposta similar a um gene precoce de expressão imediata. (52)

A deficiência do FT resulta em letalidade do embrião por desenvolvimento vascular deficiente. Durante o crescimento do embrião os vasos sanguíneos imaturos, constituídos inicialmente de uma linha de células endoteliais, adquirem uma camada muscular para acomodar o aumento da pressão sanguínea. O FT é essencial para esse processo morfogênico; vasos deficientes em FT não tem a camada muscular peri-endotelial, são frágeis, formam micro aneurismas e lagos venosos, e sangram em pontos de ruptura. A hemostasia embriônica precoce parece ser menos dependente das plaquetas e mais dependente da formação de fibrina. (49) (58)

Nas células cancerosas, a amplificação do receptor do EGF também é associada a modulação da expressão do FT. Em experimentos com linhagens celulares de câncer de endométrio houve aumento da expressão do FT dependente do EGF. (59) Em células de carcinoma de vulva a inibição do receptor do EGF diminui a expressão do FT. (60) Estudos recentes em linhagens celulares de meduloblastoma demonstraram que as quinases da família Src estimulam a indução da expressão do FT através do HGF e também como resultado da mutação no oncogene c-MET. A expressão via eixo do HGF/c-MET ativa uma resposta anti-apoptótica e de resistência a agentes quimioterápicos. (61) Além disso, a produção de TGF- β e a hipóxia têm um papel crítico no aumento da expressão do FT no câncer. (62) (63)

Figura 4. Regulação da expressão do FT no câncer.



Fonte: van den Berg et al. Blood. 2012 Jan 26;119(4):924-32

Em estudo experimental com linhagens celulares de glioma, a exposição a hipóxia levou a marcado aumento de expressão do FT em relação a exposição a oxigênio em níveis normais. As células tumorais submetidas a hipóxia foram associadas a habilidade acelerada de coagulação do plasma, efeito que pode ser bloqueado por anticorpos contra o FT ou utilizando plasma sem Fator VII. (63)

A expressão do FT foi analisada em alguns tipos de neoplasias malignas. Nakasaki et al. em estudo com 100 pacientes com câncer de cólon encontraram expressão do FT em 57% dos espécimes e a expressão correlacionou-se significativamente com a classificação de Dukes (pacientes com expressão apresentaram maior classificação). Houve correlação significativa com a expressão de VEGF e com a DMV.(64)

Khorana et al. observaram aumento da expressão do FT na maioria das neoplasias pancreáticas invasivas. De 122 espécimes de carcinoma de pâncreas ressecados, 66 (54%) expressaram níveis altos de FT; estes foram mais propensos a expressar também VEGF (80% contra 27% com baixa expressão, $p < 0,0001$) e apresentaram maior chance de tromboembolismo venoso (26,3 % contra 4,5%, $p = 0,04$). (65)

No carcinoma de pulmão não pequenas células, De Meis et al. encontraram positividade para FT em 22 de 39 pacientes estudados (56%). Nesses pacientes houve tendência a pior sobrevida a longo prazo. (66) Em trabalho de Sawada et al. com 55 pacientes houve correlação entre a positividade para o FT e metástases. (67)

Chen et al. encontraram expressão de FT em 94 (91,3%) de 103 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago. O FT foi correlacionado significativamente com a presença de metástases à distância, e nos pacientes com alta expressão a taxa de sobrevida geral foi significativamente menor ($p=0,0094$). (68)

Yamashita et al. avaliaram 207 carcinomas de estômago e encontraram expressão do FT em 41% no carcinoma tipo intestinal e 12,1% no tipo difuso. Houve correlação entre a expressão e estágio avançado da doença, maior taxa de invasão venosa e linfática além de metástase linfática no tipo intestinal. Não houve associação com o tipo difuso. (69)

No carcinoma hepatocelular, Poor et al. encontraram expressão em 100% de 58 espécimes ressecados. Houve correlação significativa com DMV e níveis de VEGF. Expressão aumentada de FT foi associada com invasão venosa, nódulos microssatélites, tumor não capsulado, estágio tumoral avançado e pior sobrevida. (70)

Sturm et al. avaliaram expressão do FT no câncer de mama. De um total de 115 espécimes, 80,8% expressaram o FT. Carcinomas ductais invasivos com

expressão mais positiva e mais alta foram menos comumente metastáticos para linfonodos quando comparados a tumores com baixa ou sem expressão; em conclusão, pacientes com tumores menos diferenciados expressaram menos o FT. (71)

Mais recentemente, Ryden et al. avaliaram as expressões do FT, PAR-1, PAR-2 e VEGF em 160 pacientes com tumores de mama, com acompanhamento médio de 50 meses. Pacientes com expressão do FT e de PAR-2 apresentaram sobrevida livre de recorrência significativamente menor, suportando a importância da sinalização do FT-PAR2.(72)

Em pacientes com melanoma, Kageshita et al. não encontraram associação com progressão da doença. De 86 espécimes estudados, 83 (96,5%) expressaram o FT. (73)

No carcinoma de próstata, Abdulkadir et al. encontraram correlação entre a angiogênese tumoral, avaliada pela densidade microvascular, e níveis de PSA, forte preditor de recorrência neste tipo de neoplasia. Dos 67 espécimes avaliados, 73% expressaram níveis aumentados de FT. Não houve correlação com o escore de Gleason, estadiamento patológico ou margens tumorais positivas. (74)

Patry et al. encontraram 77,6% de expressão em 218 amostras de tumores músculo invasivos de bexiga. Durante o acompanhamento, 45,4% dos pacientes morreram por progressão do câncer. Nos pacientes com linfonodos negativos, a positividade do FT correlacionou-se com risco 3,15 vezes maior de morte por câncer de bexiga. (75)

Em análise de 41 pacientes com nefroblastoma, Maciel et al. detectaram 88,3% de positividade para FT. A expressão alta de FT foi o fator de risco independente mais importante para recorrência e mortalidade na análise multivariada. Não houve associação com idade, tipo histológico e estadiamento. (76)

2 JUSTIFICATIVA

A busca por fatores prognósticos no câncer é objetivo contínuo na pesquisa científica. Existe correlação entre expressão do FT e piores parâmetros patológicos, clínicos e de sobrevida em alguns tipos de câncer. Não há estudos na literatura descrevendo a expressão imunoistoquímica do FT no câncer de pênis.

O presente estudo enquadra-se em linha de pesquisa da Pós-Graduação em Medicina, área de concentração em Clínica Cirúrgica, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que atualmente estuda a angiogênese e seus marcadores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

- Determinar o padrão de expressão imunoistoquímica do FT em espécimes de carcinoma epidermóide de pênis de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital São Lucas da PUCRS.

3.2 Objetivos Secundários

- Correlacionar a intensidade da expressão imunoistoquímica do FT com fatores prognósticos em câncer de pênis;
- Correlacionar a intensidade da expressão imunoistoquímica do FT com a sobrevida.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento, População e Amostra

Foi realizado um estudo de coorte histórica onde foram avaliados os dados de prontuário de 37 pacientes com câncer de pênis submetidos a penectomia parcial ou total no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS) no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2012. Três pacientes foram excluídos por indisponibilidade dos blocos de parafina; a amostra final foi de 34 pacientes.

O material ressecado foi examinado pelo Serviço de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS e classificado quanto ao diagnóstico histopatológico, estágio e grau tumoral de acordo com os critérios do TNM 2010. As lâminas de hematoxilina e eosina foram reexaminadas pelo pesquisador e por patologista experiente para confirmação dos achados quanto ao estágio patológico e grau tumoral, e para escolha dos blocos de parafina representativos do tumor.

Os prontuários dos pacientes foram revisados para a coleta dos dados pré-operatórios, estadiamento clínico e patológico, consultas de seguimento pós-operatório e óbito. Quando os dados do prontuário foram insuficientes, tentou-se contato telefônico ou por correspondência com o paciente ou com um familiar para a complementação. Os dados foram armazenados em banco de dados criados para a análise.

4.2 Critérios de Inclusão

- pacientes submetidos a penectomia parcial ou total no hospital São Lucas da PUCRS entre janeiro de 1998 e dezembro de 2012;
- carcinoma epidermóide presente no espécime cirúrgico e em tamanho suficiente para análise.

4.3 Critérios de Exclusão

- Ausência de tumor viável no bloco de parafina que para realização dos estudos histológicos e imunoistoquímica;
- Indisponibilidade dos blocos de parafina no Serviço de Patologia.

4.4 Variáveis do Estudo

4.4.1 Variável Principal

- Expressão do Fator Tecidual

4.4.2 Variáveis Secundárias

- Idade;
- Estadiamento Tumoral T TNM 2010;
- Estadiamento Linfonodal N clínico e patológico TNM 2010;
- Estadiamento por Grupos TNM 2010;
- Grau Tumoral TNM 2010;
- Tipo de cirurgia (penectomia parcial ou total);
- Sobrevida em meses
- Óbito

4.5 Análise Digital das Imagens

A captura das imagens foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS. Foi utilizado um sistema de análise digital composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40® (Carl Zeiss, Oberkochen,

Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de uma vídeo-câmera Roper Scientific (Media Cybernetics , Rockville, EUA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture kit (Media Cybernetics , Rockville, EUA). Para a análise digital das imagens foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5.1[®], que permite a captura digital da imagem e após a inserção de grade de correção, marcação e contagem da área de interesse. As imagens foram capturadas no formato TIFF (True Image Format File).

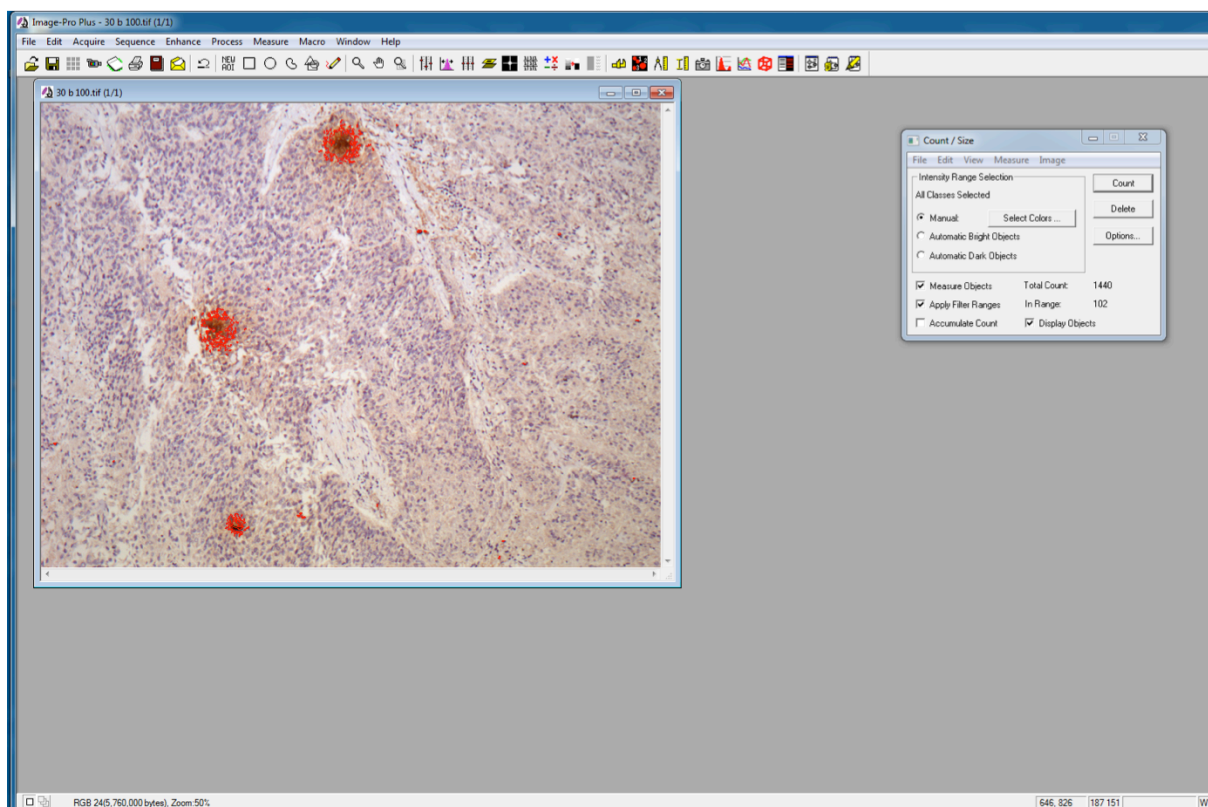


Figura 5. Imagem do software de captura do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS.

4.6 Análise da Expressão do Fator Tecidual

A expressão imunoistoquímica do FT foi avaliada com um método quantitativo; os campos microscópicos onde houve coloração positiva em magnificação de 100 x foram selecionados e digitalizados, sem superposição de imagens. O número de imagens selecionadas para cada caso variou de uma a cinco, conforme maior ou menor coloração. Cada arquivo de imagem continha uma área total de 361,918 μm^2 . Em todas as imagens capturadas as análises foram feitas com método de seleção de cores de 24-bit, com criação de arquivos de cor RGB de referência para aplicação em todas as imagens para mensuração da área de expressão. Resultados foram expressos em μm^2 . Dois observadores independentes e familiarizados com a técnica concordaram com o processo de seleção das áreas examinadas em todos os casos. As lâminas foram analisadas sem o conhecimento prévio da evolução clínica dos pacientes.

4.7 Imunoistoquímica

Foram realizados cortes com espessura de 5 μm nas lâminas incluídas em parafina imediatamente subsequentes à identificação do tumor de pênis. Estas foram submetidas à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peridrol a 3% (H₂O₂ em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em solução salina a 5% em tampão PBS (“phosphate-binding saline”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (background). As secções foram então incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-Fator Tecidual humano tipo I (Mouse anti-human tissue factor, type 1 U.S. Biological – type Mab, IgG1 clone 2K1) com diluição de 1:30. O sistema de detecção utilizado foi o kit Dako LSAB + peroxidase (Streptoavidina). Os

cortes foram revelados utilizando-se cromógeno 3,3'diaminoazobenzidina (DAB) e tampão PBS em solução a 0,002% de peróxido de hidrogênio e contra-corados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e montados com bálsamo e lamínula.

4.8 Análise Estatística

Dados contínuos foram descritos utilizando média e desvio padrão. Para dados assimétricos foram utilizados mediana e amplitude interquartis. Dados categóricos foram expressos utilizando frequências e percentuais. As comparações entre grupos dos dados contínuos foram realizadas através do teste t de Student. Para os dados categóricos, a comparação foi pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher quando apropriado.

A análise da sobrevida dos pacientes foi calculada utilizando-se o método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas pelo teste de log-rank. As variáveis consideradas de relevância clínica para a sobrevida foram selecionadas como fator de ajuste para uma análise de regressão multivariável (regressão por modelo de Cox) com expressão da força de associação pelo “hazard ratio”, com seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas Excel e SPSS v 18.0® para Windows. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4.9 Ética

A pesquisa está em conformidade com as normas internas do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS e com os itens III.3.i e III.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como a diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993).

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Científica da Faculdade de Medicina e do Hospital São Lucas da PUCRS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Protocolo no 506.540.

Foi preenchido o Termo de Compromisso para Utilização de Dados em Prontuários e de Bases de Dados em Projetos de Pesquisa e solicitada a dispensa do Termo de Consentimento quando não foi possível contato com o paciente.

5 RESULTADOS

Entre 1998 e 2012, 37 pacientes foram submetidos a penectomia parcial ou radical no HSL. Três casos foram excluídos por impossibilidade de uso do bloco de parafina. A histologia de todos os tumores foi carcinoma epidermóide de pênis.

Dentre os 34 espécimes de carcinoma de pênis avaliados, em 26 (76,4%) houve expressão do FT e em 8 (23,6%) não houve expressão. A média da expressão foi de $27,82 \mu\text{m}^2$ [IC 95% 20,00 – 35,65, DP 22,40]. O valor da mediana foi de $27,84 \mu\text{m}^2$. A Figura 6 mostra a distribuição da amostra, valor mínimo e máximo, mediana e percentis 25 e 75 da expressão do FT.

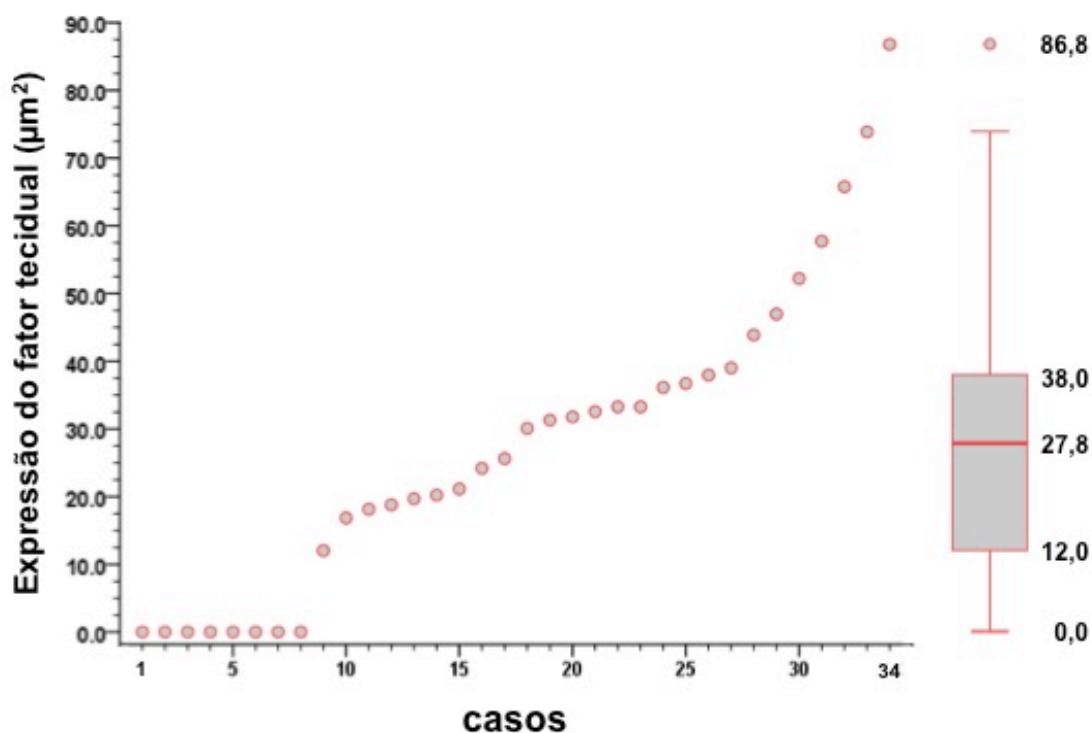


Figura 6. Distribuição da expressão do Fator Tecidual.

A amostra foi então dividida em dois grupos, com expressão do FT $\geq 28 \mu\text{m}^2$ e com do FT $< 28 \mu\text{m}^2$, cada um com 17 pacientes. A escolha deste ponto de corte foi através da mediana das áreas mensuradas em todos os casos. Foram examinadas as relações entre a expressão do FT e as variáveis em estudo: idade, estadiamento tumoral T, comprometimento linfonodal clínico e patológico, Grau tumoral, estadiamento em grupos TNM e óbito.

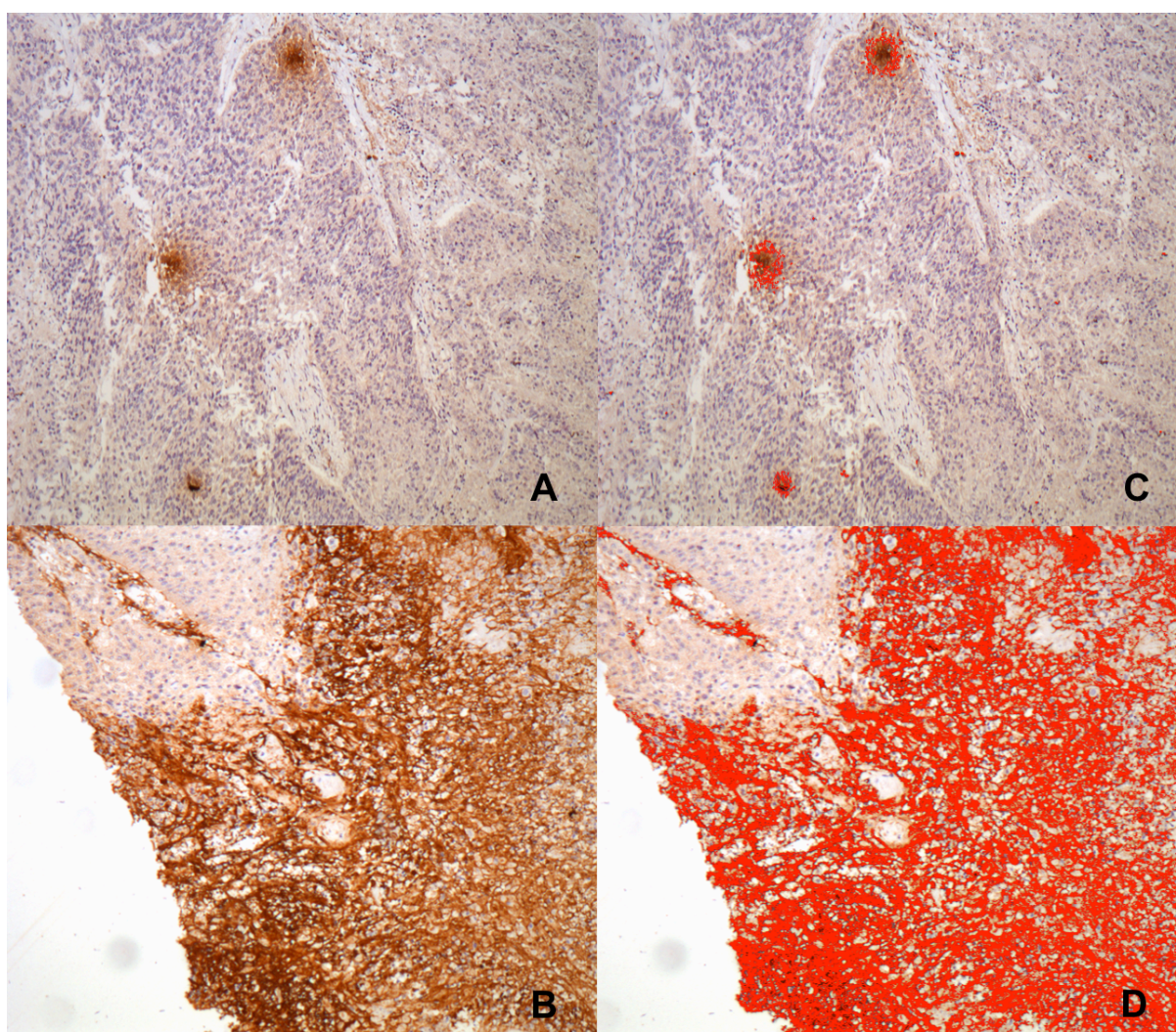


Figura 7. Expressão do FT no câncer de pênis. A: Baixa expressão (área $< 28 \mu\text{m}^2$); **B:** Alta expressão (área $\geq 28 \mu\text{m}^2$) (Em 100x). **C e D:** imagens capturadas em RGB com as áreas de expressão marcadas em vermelho.

A idade média geral dos pacientes foi de 62,5 anos (mínima de 42,2 e máxima de 91,7 anos, DP 14,2). Houve diferença significativa em relação a idade entre os grupos com expressão $\geq 28 \mu\text{m}^2$ e $< 28 \mu\text{m}^2$ [57,6 anos (DP 9,9) contra 67,3 anos (DP 16,4), $p = 0,047$].

Do total de tumores ressecados 16 (47,1%) invadiam o tecido conjuntivo subepitelial (T1), 6 (17,6%) invadiam o corpo esponjoso e/ou o corpo cavernoso (T2) e 12 (35,3%) invadiam a uretra (T3). Nenhum tumor ressecado invadia outras estruturas, como a próstata ou púbis (T4), ou não invadia tecido subepitelial (Ta).

Quanto ao grau de diferenciação tumoral, 14 (41,2%) eram bem diferenciados, 19 (55,9%) eram moderadamente diferenciados e 1 (2,9%) era pouco diferenciado. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação a expressão do FT, embora apenas no grupo de expressão $\geq 28 \mu\text{m}^2$ houve um caso de tumor pouco diferenciado. Nenhum caso de tumor indiferenciado foi encontrado na amostra.

Foram submetidos a linfadenectomia inguinal bilateral 12 pacientes (35,3%). 5 pacientes apresentaram linfonodos positivos e 7 pacientes apresentaram linfonodos negativos. Não houve diferença estatística na expressão do FT entre os grupos.

Vinte e um pacientes foram tratados com penectomia parcial (61,8%), enquanto 13 foram tratados com penectomia radical (38,2%).

Trinta e três pacientes (97%) eram brancos e 1 paciente era negro (3%). A expressão neste paciente foi de $83 \mu\text{m}^2$, em Tumor T3N0M0 Grau 2.

Além da idade, não foi identificada diferença estatística entre os grupos de expressão de FT e as outras variáveis em estudo. As características da amostra estão sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características dos pacientes segundo nível de expressão do FT.

Característica	Total n = 34	Expressão do FT (μm^2)		p
		FT \geq 28 n = 17	FT < 28 n = 17	
Idade, anos	62 \pm 14	58 \pm 10	67 \pm 16	0,047 ^a
Tipo de tumor, n ^o (%)				0,63 ^b
T1a	14 (41,2)	5 (29,4)	9 (52,9)	
T1b	2 (5,9)	1 (5,9)	1 (5,9)	
T2	6 (17,6)	4 (23,5)	2 (11,8)	
T3	12 (35,3)	7 (41,2)	5 (29,4)	
Linfonodos, n ^o (%)				0,76 ^b
cN0	23 (67,6)	11 (64,7)	12 (70,6)	
cN1	-	-	-	
cN2	8 (23,5)	5 (29,4)	3 (17,6)	
cN3	3 (8,8)	1 (5,9)	2 (11,8)	
Linfonodos, n (%)				0,58 ^b
pNx	22 (64,7)	9 (52,9)	13 (76,4)	
pN0	7 (20,6)	5 (29,4)	2 (11,8)	
pN1	-	-	-	
pN2	4 (11,8)	3 (17,7)	1 (5,9)	
pN3	1 (2,9)	-	1 (5,9)	
Estadiamento, n ^o (%)				0,80 ^b
I	10 (29,4)	4 (23,5)	6 (35,3)	
II	13 (38,2)	7 (41,2)	6 (35,3)	
IIIa	-	-	-	
IIIb	8 (23,5)	5 (29,4)	3 (17,6)	
IV	3 (8,8)	1 (5,9)	2 (11,8)	
Grau tumoral				>0,99 ^b
G1	14 (41,2)	7 (41,2)	7 (41,2)	
G2	19 (55,9)	9 (52,9)	10 (58,8)	
G3	1 (2,9)	1 (5,9)	-	
Penectomia, n ^o (%)				0,16 ^b
parcial	21 (61,8)	8 (47,1)	13 (76,5)	
total	13 (38,2)	9 (52,9)	4 (23,5)	

Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão ou contagens (percentuais). FT: fator tecidual, p: significância estatística, a: teste t de Student, b: teste exato de Fisher.

O seguimento médio foi de 28,3 meses (intervalo de 1 a 139,6 meses). Durante o acompanhamento houve 8 óbitos (23,5% dos pacientes), 4 em cada grupo, todos relacionados a neoplasia. Não houve diferença estatística entre os grupos. A taxa KM aos 24, 36 e 60 meses está sumarizada na tabela 4.

Tabela 4 – Óbitos segundo nível de expressão do FT e estimativa de sobrevida KM.

Característica	Total n = 34	Expressão do FT (μm^2)		p
		FT \geq 28 n = 17	FT < 28 n = 17	
Óbito				
eventos, n ^o (%)	8 (23,5)	4 (23,5)	4 (23,5)	>0,99 ^a
taxa KM (%)				0,50 ^b
24 meses	78,6	75,5	80,8	
36 meses	71,5	75,5	69,3	
60 meses	55,6	50,3	57,7	

Os dados são apresentados com contagens (percentuais).

FT: fator tecidual, KM: estimativa Kaplan-Meier, p: significância estatística, a: teste exato de Fisher, b: teste de log-rank.

A sobrevida geral estimada por Kaplan-Meier foi de 102,8 meses (IC 95% 69,0 a 136,7).

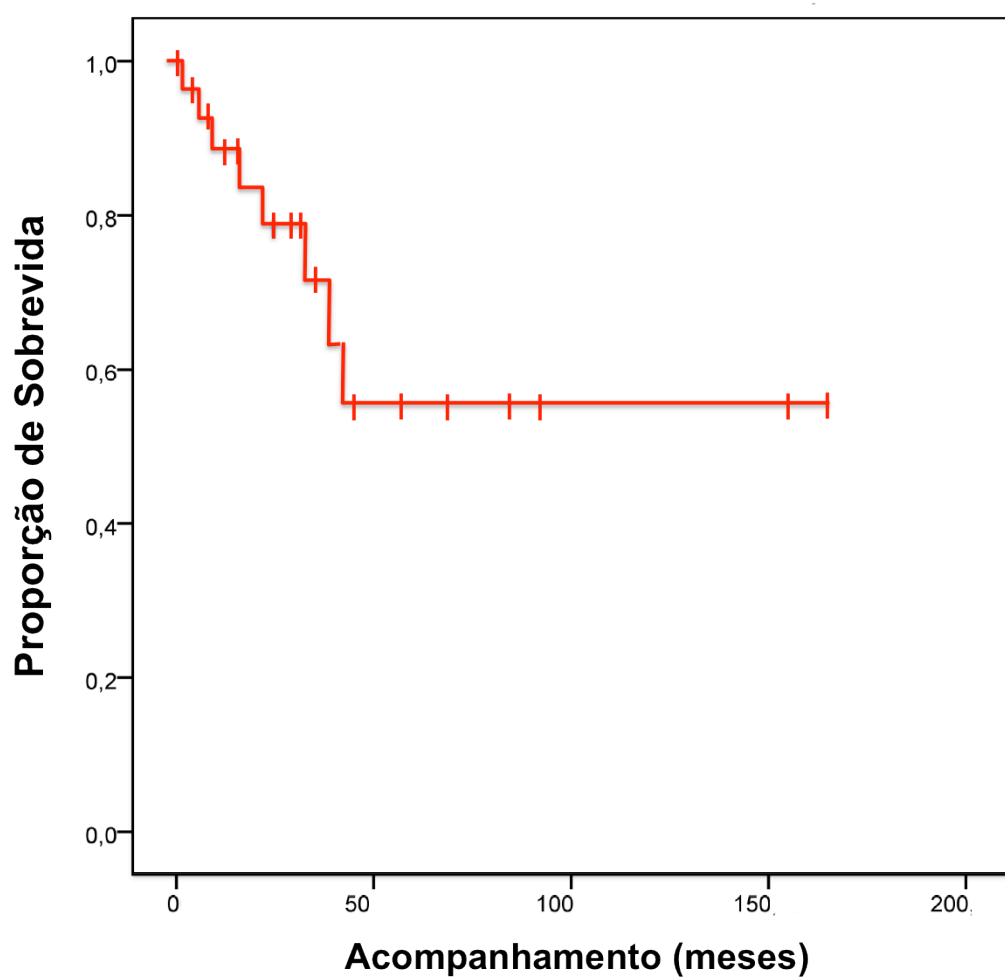


Figura 8. Curva de sobrevida global.

A sobrevida por Kaplan-Meier nos pacientes com $FT \geq 28 \mu\text{m}^2$ foi de 57,7 meses (IC 95% 30,6 – 84,7) e no grupo $FT < 28 \mu\text{m}^2$ foi de 107,3 meses (IC 95% 64,2 – 150,4). Não houve diferença estatística entre os grupos.

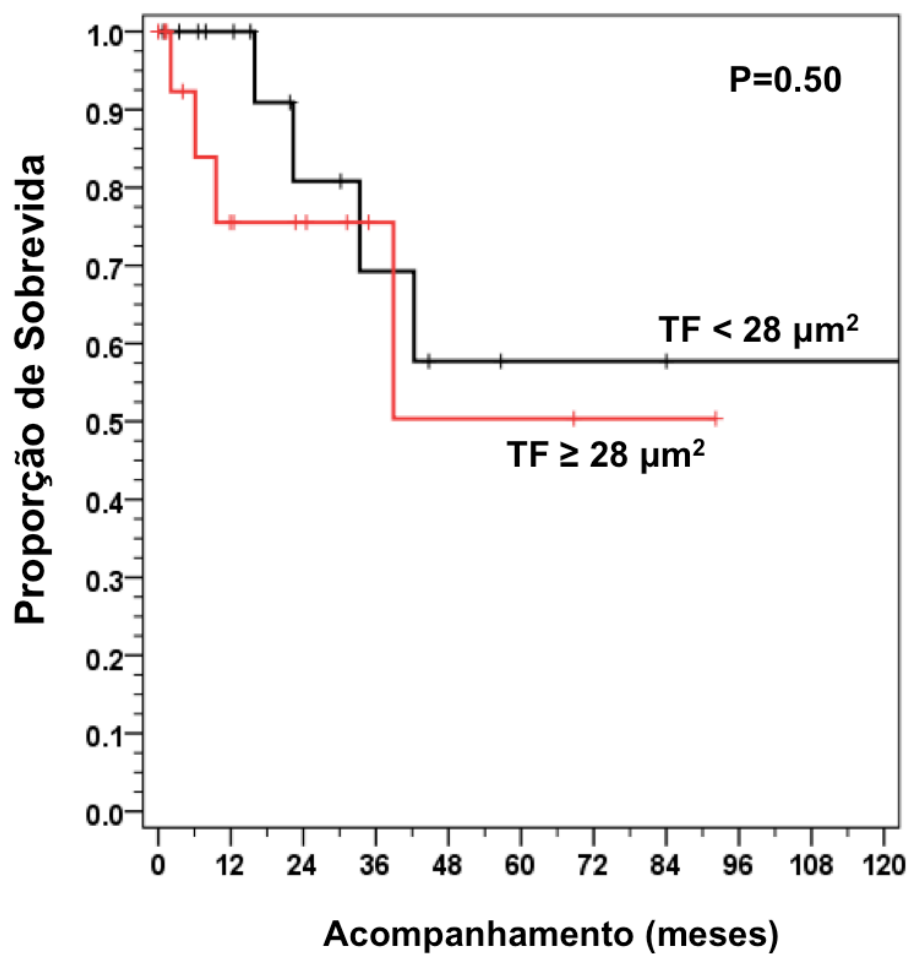


Figura 9. Curva de sobrevida estratificada por expressão do FT.

Foram examinadas as correlações entre as categorias de expressão e as variáveis do estudo por modelo de Regressão de Cox. Não houve correlação estatística entre a expressão do FT e nenhuma variável. A expressão aumentada do FT tendeu a ter significância estatística após o ajuste para a idade HR 7,78 (IC 95% 0,90 a 67,09; $p=0,062$).

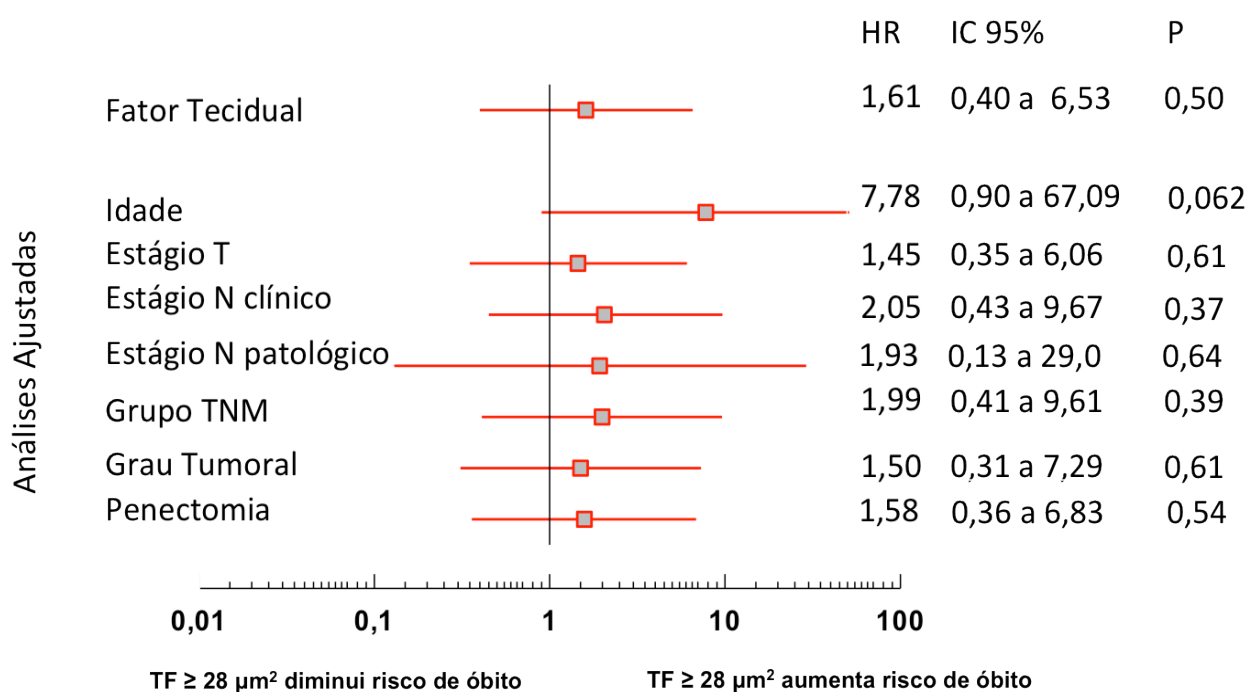


Figura 10. Gráfico Forest – Análise Multivariada.

A expressão do FT foi submetida a análise multivariável (regressão de Cox) ajustada para os principais fatores prognósticos: idade maior que 65 anos, estágio tumoral T2-3, estadiamento linfonodal clínico positivo, estadiamento linfonodal patológico positivo (linfadenectomia inguinal bilateral com linfonodos positivos), estágio TNM IV-V, Grau de diferenciação tumoral G2-3. Não houve correlação estatística entre a expressão do FT e nenhum desses fatores prognósticos.

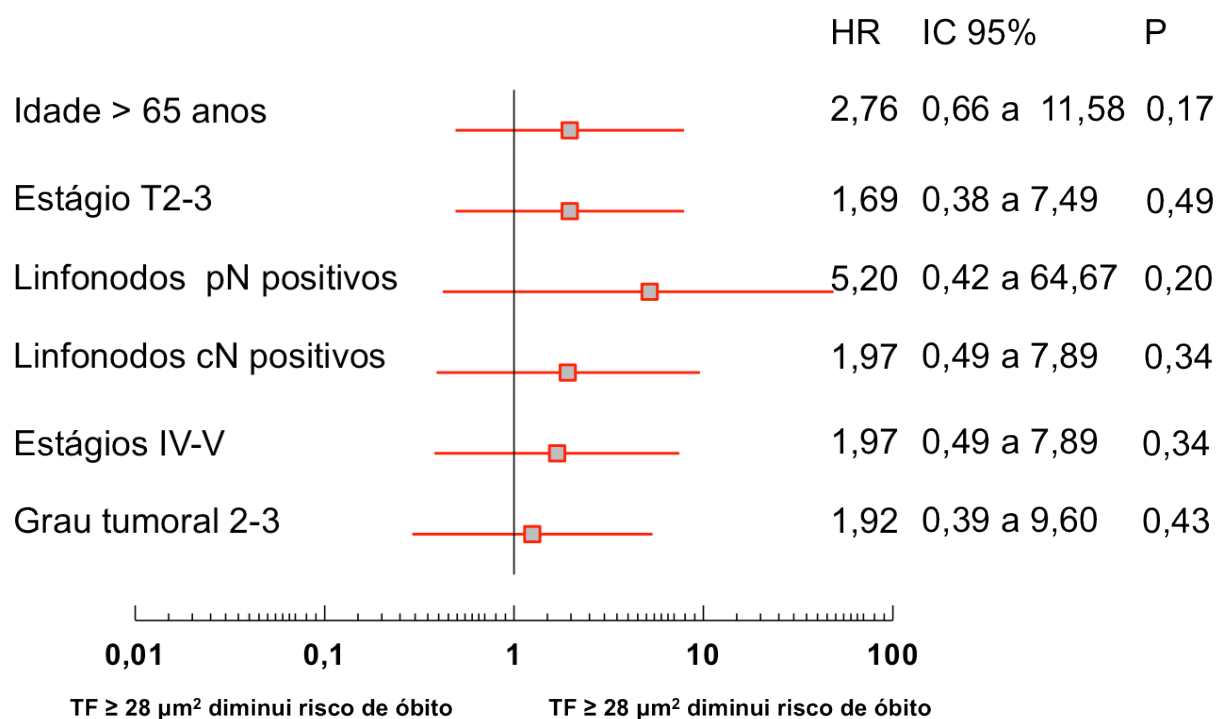


Figura 11. Gráfico Forest Análise Multivariada – fatores prognósticos no câncer de pênis.

6 DISCUSSÃO

O câncer de pênis é um tumor incomum mas com incidência significativamente alta em algumas áreas de países em desenvolvimento e nos países subdesenvolvidos. O Brasil tem uma das mais altas incidências de câncer de pênis no mundo; a frequência varia dependendo da região considerada, e é diretamente relacionada com condições socioeconômicas locais. (8)

Estudos epidemiológicos em câncer, e no câncer de pênis em especial, ainda são pouco realizados em nosso meio. Entre maio de 2006 e junho de 2007, a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) conduziu estudo epidemiológico multicêntrico no qual solicitou aos urologistas que diagnosticassem novos casos de câncer de pênis o preenchimento de um questionário para confecção de banco de dados unificado. Foram enviados 283 questionários; a maioria dos casos (149 casos, 53,2%) foi reportada nas regiões norte e nordeste, as áreas do país com menor índice de desenvolvimento. A região sul, com índice de desenvolvimento mais alto, contribuiu com apenas 2 casos (0,71%). (77)

Muitos pacientes com câncer de pênis experimentam atraso no diagnóstico. A apresentação pode variar de uma endureção sutil a uma pequena pápula, verruga ou lesões mais exofíticas. A detecção precoce pode ser feita pelo próprio paciente ou parceira, com ajuda de atenção médica primária. Mesmo com a procura de atendimento médico pode haver atraso a chegada ao urologista. Lucky et al. avaliaram 100 pacientes entre dezembro de 2002 a dezembro de 2007 atendidos em clínica referência regional para tratamento de câncer de pênis no Reino Unido. O tempo entre o início dos sintomas e a procura a atendimento médico variou de 2 dias a 24 meses, com média de 5,8 meses. A maior causa de atraso foi a relutância do paciente em procurar atendimento. Dezenove por cento dos pacientes foram encaminhados a outros especialistas após o primeiro atendimento. O tempo médio para estes pacientes consultarem com o urologista após isso foi de 3,5 a 6 meses. 47% dos pacientes apresentaram-se com doença localmente avançada. (78)

O encaminhamento precoce para especialista ou centro de atenção especializado em tratamento de câncer é recomendado já que o tratamento é feito muitas vezes com abordagem multidisciplinar. Antes do tratamento devem ser discutidos amplamente com o paciente os resultados esperados e as consequências das diferentes opções terapêuticas. Suporte psicossocial pode ser útil para estes pacientes.

Romero et al. compararam os escores dos questionários da IIEF para avaliação de função erétil, função orgásmica, desejo sexual, satisfação com o intercurso e satisfação geral com vida sexual em 18 pacientes submetidos a penectomia parcial. Os escores pré e pós operatórios foram significativamente diferentes para todos os aspectos da função sexual. Apenas 33,3% dos pacientes mantiveram a frequência sexual prévia e estavam satisfeitos a vida sexual. (79) Em estudo de Opjordsmoen et al., 7 (23%) de 30 pacientes tratados para câncer de pênis relataram que se fossem perguntados novamente iriam escolher um tratamento com menor sobrevida para aumentar a chance de permanecerem sexualmente potentes. (80)

Pacientes tipicamente apresentam-se entre 50 e 70 anos de idade. Nos EUA, a média é de 68 anos; os negros apresentam idade significativamente menor (62 anos) em relação aos brancos (68 anos). (14) Na nossa amostra a idade média foi de 62 anos, com mínima de 42 e máxima de 91 anos. Quinze por cento dos pacientes apresentavam 45 anos de idade ou menos. Favorito et al. reportaram 7,41% dos pacientes com menos de 35 anos de vida. (77) Salienta-se a importância da pesquisa de neoplasia em jovens com lesões penianas, o que muitas vezes não é considerado.

Os dados de tabagismo não estavam disponíveis na maior parte dos casos em nossa amostra e por isto não foram analisados. Em estudo de Helberg et al. com 244 pacientes com câncer de pênis e 232 pacientes no grupo controle o tabagismo foi fator de risco independente para o surgimento da neoplasia. (81) Parece haver efeito dose-resposta no aumento do risco nos pacientes com câncer de pênis. (82)

Existe uma limitada literatura científica com relação a preponderância racial ou étnica no câncer de pênis. No estudo da SBU, dos 283 pacientes, 214 (75,61) eram brancos, 63 (22,26%) negros e 6 (2,12%) orientais. (77) Nos EUA, a incidência do câncer de pênis é 72% maior em hispânicos do que não hispânicos, independente da idade. O aumento do risco em hispânicos podem ser relacionados pelo menos em parte com a não circuncisão, por aumentar risco de HPV e câncer de pênis. O aumento nas taxas de câncer de pênis nos hispânicos nos EUA ocorre em paralelo com aumento no risco de câncer de colo de útero entre as mulheres hispânicas. (14)

Nosso estudo encontrou proporção de 97% de brancos e 3% de negros. Com apenas um paciente negro, uma análise comparativa adequada não pode ser feita. Este resultado pode ser reflexo do tamanho da amostra do estudo, da etnia da população do Rio Grande do Sul (o censo do IBGE de 2010 apontava 83,2% da população do estado como branca) e também com a dificuldade no acesso a saúde das diferentes etnias. Este último fator está mais intimamente relacionado com o características socioeconômicas do que as étnicas.

Semelhante ao encontrado em outros estudos na literatura, a maioria (53%) dos pacientes no nosso estudo apresentavam doença avançada (tumores T2 ou maiores) na época do tratamento. Favorito et al. reportaram 58% dos pacientes com doença avançada. (77) (83) O estágio avançado é fortemente correlacionado com o grau de invasão, probabilidade de metástases loco-regionais, doença sistêmica e pior prognóstico. Esse achado pode ser relacionado ao atraso na procura ao atendimento médico, por medo, vergonha ou ignorância, ou na dificuldade de acesso aos serviços de atendimento médico, sejam de atenção primária ou hospitais terciários.

A presença e extensão de metástases inguinais é o fator prognóstico mais importante para a sobrevida em pacientes com câncer de pênis. A fase de crescimento loco-regional é prolongada antes da disseminação à distância e a

linfadenectomia pode ser curativa em alguns casos. A sobrevida em pacientes com linfonodos positivos cai significativamente. Em pacientes não tratados, com envolvimento linfonodal, é de 2 a 3 anos, enquanto a linfadenectomia é curativa em 40-50% destes pacientes. (21) Em nosso estudo, 14,7% dos pacientes apresentaram linfonodos positivos no estadiamento patológico. A sobrevida estimada por KM aos 60 meses foi de 55,6, sem diferença estatística entre os grupos de expressão do FT (50,3 para expressão $\geq 28 \mu\text{m}^2$ contra 57,7 para expressão $< 28 \mu\text{m}^2$) Em comparação com a sobrevida publicada em outras séries, os resultados da sobrevida em nossa amostra podem ser explicados pela alta proporção de tumores com doença avançada e a prevalência de pacientes com linfonodos positivos na análise patológica (41,7% dos pacientes submetidos a linfadenectomia).

A interação entre o crescimento de células malignas e problemas da coagulação há muito tem sido estudada, mas os mecanismos geradores da associação entre tromboembolismo e câncer permanecem entendidos incompletamente. Como um tumor localizado produz uma coagulopatia sistêmica tem sido uma questão central. Trabalhos experimentais sugerem que a coagulação e a fibrinólise tem papel importante no crescimento, invasão e disseminação tumorais e na formação de metástases. (84) A expressão do fator tecidual contribui para a atividade pro coagulante derivada do tumor e a associação clínica entre neoplasia maligna e trombose. (51)

Além da trombina, alguns produtos mais distais na cascata da coagulação podem influenciar a formação de metástases. A formação de fibrina ao redor de células tumorais metastáticas pode proteger estas células da ação de células do sistema imune. Em modelo experimental com injeção intravenosa de células de

fibrossarcoma com expressão de FT houve falha em desenvolver metástase em camundongos deficientes em fibrinogênio. (85) Duas novas isoformas de FT, o FTas e o FT-A estão também aumentadas no câncer, mas suas funções na progressão do câncer e trombose permanecem em investigação. Já existem evidências da detecção do FTas em gliomas, câncer gástricos, câncer colorretal, câncer de pulmão não pequenas células e melanomas. (86)

Existem amplas evidências de que o FT é abundantemente expresso em uma variedade de neoplasias malignas, como a de mama (71), pulmão (66, 67), esôfago (68), estômago (69), pâncreas (65), cólon (64), fígado (70), bexiga (75), rim (76), próstata (74), melanomas (73) e gliomas (87). Na maioria destes estudos a expressão do FT foi um preditor independente de pior sobrevida ou recorrência do tumor, embora alguns estudos não houve correlação. (66, 73) Possíveis explicações para estes achados podem ser diferenças entre as amostras de pacientes, tipo de técnica de detecção e pequena amostra.

Não existem estudos com a avaliação da expressão do fator tecidual no câncer de pênis para compararmos. Na nossa amostra houve expressão em 76% dos casos. A análise bivariada e multivariada não mostrou diferença estatística entre os grupos com relação a expressão do FT. O HR calculado foi de 1,61 (IC 95% 0,40 – 6,53; $p = 0,50$). Quando houve correção para a idade, houve tendência a significância; o HR calculado foi de 7,78 (IC 95% 0,90 – 67,09; $p = 0,062$).

Nosso estudo tem algumas limitações. Embora os esforços tenha sido feitos para colocar pacientes consecutivos, a análise foi retrospectiva. Em adição, o uso de imunoistoquímica por amostra de tecido pode subestimar a frequência do FT, principalmente em tumores com expressão focal. Entretanto, vários estudos compararam a expressão de biomarcadores mostrando 70 a 100% de concordância entre a análise por amostra e análise de toda a peça. (75) Outra crítica aos estudos de imunoistoquímica é a falta de objetividade na leitura dos slides e escore da coloração. A maioria dos estudos realizou análise qualitativa, com a seguinte graduação: categoria 1 (0 a 25% das células com carcinoma coradas), categoria 2

(26 a 50% das células com carcinoma coradas), categoria 3 (51 a 75% das células com carcinoma coradas) e categoria 4 (76 a 100% das células com carcinoma coradas).

A escolha em nosso trabalho pela análise quantitativa da expressão justificou-se pela tentativa de diminuir a subjetividade na aferição dos escores de positividade e nas variações na interpretação entre os observadores. A captura padronizada das imagens e a contagem através de programa de computador diminuem os problemas referidos. Permanece como elemento não-objetivo a escolha das áreas representativas do tumor. No presente estudo as escolhas foram realizadas por dois observadores treinados e houve concordância em todos os casos. Os espécimes de tecido foram obtidos em um único hospital e foram processados do mesmo modo e no mesmo momento, por técnico de patologia com experiência no método.

Possível viés com relação a mortalidade pode ser decorrente do registro desatualizado do status clínico de alguns pacientes onde houve perda do seguimento. Muitos pacientes fizeram apenas a cirurgia e a primeira revisão no Hospital São Lucas da PUCRS e retornaram a suas equipes assistentes. O contato com os pacientes que foram submetidos a cirurgia antes da informatização dos prontuários ambulatoriais (2009) foi mais difícil. Muitos cadastros estavam com números de telefone ou endereços desatualizados e, em alguns casos de pacientes moradores de áreas rurais, não havia telefone ou endereço para localização.

Além dos atuais tratamentos cirúrgico, farmacológico e radioterapêutico, novas drogas estão em desenvolvimento especificamente para atuar na sinalização e nos processos angiogênicos. Embora estudos investigando a terapia alvo ao FT no tratamento do câncer sejam esparsos, esta modalidade de tratamento pode ser benéfica. Atualmente 2 potenciais drogas para terapia alvo do FT estão em investigação em estudos clínicos: ALT-836 (Altor Bioscience), um anticorpo inibidor do FT, e o PCI-27483 (Pharmacyclics), molécula inibidora do FVIIa. A eficácia do ALT-836 está sendo investigada em tumores sólidos em combinação com a gencitabina, enquanto o PCI-27483 está limitado a pacientes com câncer de pâncreas. Os resultados destes estudos serão uteis para decisão se a terapia alvo

contra o FT pode ser opção viável no futuro para o tratamento do câncer e da trombose relacionada ao câncer. Além disso, outra terapia promissora é, aproveitando a expressão aumentada do FT nas células cancerosas, combinar drogas antitumorais com partes do FVII, formando proteínas quiméricas capazes de se ligarem ao FT. (57)

O entendimento da história natural, correto diagnóstico e estadiamento, seleção do tratamento adequado e seguimento apropriado são fundamentais para os resultados oncológicos e qualidade de vida nos pacientes com câncer de pênis. O tratamento com cirurgia continua sendo o padrão para o câncer de pênis, e em alguns casos com linfonodos comprometidos a linfadenectomia subsequente pode ser curativa. Além disso, o câncer de pênis é uma das poucas neoplasias em que medidas simples podem ter importante impacto na prevenção. Sejam elas comportamentais, como melhora da higiene, da educação ou mesmo cirúrgicas, como a circuncisão.

Esse é o primeiro relato da expressão do FT no câncer de pênis. Em nosso estudo não houve correlação entre a expressão do FT e piora da sobrevida ou comprometimento linfonodal, apesar das limitações de pouca amostra. Esse estudo deverá servir de base para novos trabalhos para avaliação do papel do FT na neoplasia de pênis.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente estudo permitiu chegar às seguintes conclusões:

- 1- Ocorreu expressão do fator tecidual em 76% dos espécimes de carcinoma epidermóide de pênis
- 2- A media de expressão do FT foi 28,2 μm^2
- 3- Não houve correlação entre a intensidade da expressão do Fator tecidual e os fatores prognósticos estudados
- 4- Não houve correlação entre a intensidade da expressão com a sobrevida dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lynch DF PC. Tumors of the penis In: Walsh PC (ed) Campbell's Urology. 8 ed ed2002.
2. Parkin DMW, S.L. ; Ferlay, J. Cancer incidence in five continents. Volume VIII. IARC scientific publications. 2002(155):1-781. Epub 2003/06/19.
3. Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Penile cancer. Journal of the American Academy of Dermatology. 2006;54(3):369-91; quiz 91-4. Epub 2006/02/21.
4. Carver BS MJ, Venable DD, Eastham JA. . Squamous cell carcinoma of the penis: a retrospective review of forty-five patients in northwest Louisiana. . South Med J 2002;95:4.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians. 2013;63(1):11-30. Epub 2013/01/22.
6. Kamat MR KJ, Tongaonkar HB. . Carcinoma of the penis: the Indian experience. . J Surg Oncol. 1993;52:6.
7. Gursel EO GC, Uson AC, Melicow MM, Veenema RJ. Penile cancer. Urology 1973;1:10.
8. R B. Câncer do Brasil: dados histopatológicos 1976-80: resultados. Campanha Nacional de Combate ao Câncer;Ministério da Saúde1982. p. 118.
9. Câncer INd. Câncer no Brasil: dados de registros de base populacional. . In: Saúde SdAaoa, editor. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2003.
10. Frisch M, Friis S, Kjaer SK, Melbye M. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population (Denmark 1943-90). BMJ. 1995;311(7018):1471. Epub 1995/12/02.
11. Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sontipong S, Sriamporn H, et al. Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 1995;4(5):475-83. Epub 1995/07/01.
12. AAC dP. Revista Brasileira de Cancerologia 2005;51(3):10.
13. Rippentrop JM, Joslyn SA, Konety BR. Squamous cell carcinoma of the penis: evaluation of data from the surveillance, epidemiology, and end results program. Cancer. 2004;101(6):1357-63. Epub 2004/08/19.
14. Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, Giuliano A, Goodman MT, King JB, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003. Cancer. 2008;113(10 Suppl):2883-91. Epub 2008/11/05.
15. Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. The lancet oncology. 2004;5(4):240-7. Epub 2004/03/31.
16. Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, Hislop TG, Teh CZ, Ashley RL, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. Journal of the National Cancer Institute. 1993;85(1):19-24. Epub 1993/01/06.
17. Reynolds SJ, Shepherd ME, Risbud AR, Gangakhedkar RR, Brookmeyer RS, Divekar AD, et al. Male circumcision and risk of HIV-1 and other sexually transmitted infections in India. Lancet. 2004;363(9414):1039-40. Epub 2004/03/31.

18. Circumcision policy statement. *Pediatrics*. 2012;130(3):585-6. Epub 2012/08/29.
19. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;116(4):606-16. Epub 2005/04/13.
20. Wiener JS, Walther PJ. The association of oncogenic human papillomaviruses with urologic malignancy. The controversies and clinical implications. *Surgical oncology clinics of North America*. 1995;4(2):257-76. Epub 1995/04/01.
21. Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World journal of urology*. 2009;27(2):141-50. Epub 2008/07/09.
22. Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H, et al. EAU penile cancer guidelines 2009. *European urology*. 2010;57(6):1002-12. Epub 2010/02/19.
23. Harish K, Ravi R. The role of tobacco in penile carcinoma. *British journal of urology*. 1995;75(3):375-7. Epub 1995/03/01.
24. Micali G, Nasca MR, Innocenzi D. Lichen sclerosus of the glans is significantly associated with penile carcinoma. *Sexually transmitted infections*. 2001;77(3):226. Epub 2001/06/13.
25. Zequi Sde C, Guimaraes GC, da Fonseca FP, Ferreira U, de Matheus WE, Reis LO, et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer. A multicenter study. *The journal of sexual medicine*. 2012;9(7):1860-7. Epub 2011/10/26.
26. Gursel EO, Georgountzos C, Uson AC, Melicow MM, Veenema RJ. Penile cancer. *Urology*. 1973;1(6):569-78. Epub 1973/06/01.
27. Skeppner E, Andersson SO, Johansson JE, Windahl T. Initial symptoms and delay in patients with penile carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 2012;46(5):319-25. Epub 2012/09/20.
28. Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *British journal of cancer*. 2000;83(2):164-70. Epub 2000/07/20.
29. Ficarra V, Akduman B, Bouchot O, Palou J, Tobias-Machado M. Prognostic factors in penile cancer. *Urology*. 2010;76(2 Suppl 1):S66-73. Epub 2010/08/19.
30. Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, Santos MW, Jr., Tamboli P, Ro JY, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. *The Journal of urology*. 2001;165(4):1138-42. Epub 2001/03/21.
31. Horenblas S, van Tinteren H. Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. *The Journal of urology*. 1994;151(5):1239-43. Epub 1994/05/01.
32. Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, Dai B, Ye DW. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. *BJU international*. 2007;100(1):204-8. Epub 2007/04/17.
33. Lopes A, Bezerra AL, Pinto CA, Serrano SV, de Mell OC, 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. *The Journal of urology*. 2002;168(1):81-6. Epub 2002/06/07.

34. Campos RS, Lopes A, Guimaraes GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology*. 2006;67(4):797-802. Epub 2006/03/29.
35. 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. *Histology and histopathology*. 2007;22(11):1197-204. Epub 2007/07/25.
36. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010. xiv, 648 p. p.
37. Narayana AS OL, Loening SA, Weimar GW, Culp DA. . Carcinoma of the penis, analysis of 219 cases. *Cancer* 1982;49:7.
38. Minhas S, Kayes O, Hegarty P, Kumar P, Freeman A, Ralph D. What surgical resection margins are required to achieve oncological control in men with primary penile cancer? *BJU international*. 2005;96(7):1040-3. Epub 2005/10/18.
39. Kattan MW, Ficarra V, Artibani W, Cunico SC, Fandella A, Martignoni G, et al. Nomogram predictive of cancer specific survival in patients undergoing partial or total amputation for squamous cell carcinoma of the penis. *The Journal of urology*. 2006;175(6):2103-8; discussion 8. Epub 2006/05/16.
40. 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. *The Journal of urology*. 1994;151(5):1244-9. Epub 1994/05/01.
41. Novara G, Galfano A, De Marco V, Artibani W, Ficarra V. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *Nature clinical practice Urology*. 2007;4(3):140-6. Epub 2007/03/10.
42. Pandey D, Mahajan V, Kannan RR. Prognostic factors in node-positive carcinoma of the penis. *J Surg Oncol*. 2006;93(2):133-8. Epub 2006/01/21.
43. Ravi R. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. *British journal of urology*. 1993;72(5 Pt 2):817-9. Epub 1993/11/01.
44. Pizzocaro G, Piva L, Bandieramonte G, Tana S. Up-to-date management of carcinoma of the penis. *European urology*. 1997;32(1):5-15. Epub 1997/01/01.
45. Pagliaro LC, Williams DL, Daliani D, Williams MB, Osai W, Kincaid M, et al. Neoadjuvant paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin chemotherapy for metastatic penile cancer: a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(24):3851-7. Epub 2010/07/14.
46. Rickles FR, Edwards RL, Barb C, Cronlund M. Abnormalities of blood coagulation in patients with cancer. Fibrinopeptide A generation and tumor growth. *Cancer*. 1983;51(2):301-7. Epub 1983/01/15.
47. Sun NC, McAfee WM, Hum GJ, Weiner JM. Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred eight patients. Part I. Coagulation studies. *American journal of clinical pathology*. 1979;71(1):10-6. Epub 1979/01/01.
48. Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *The lancet oncology*. 2004;5(11):655-63. Epub 2004/11/04.
49. Anand M, Brat DJ. Oncogenic regulation of tissue factor and thrombosis in cancer. *Thrombosis research*. 2012;129 Suppl 1:S46-9. Epub 2012/06/15.
50. Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *International journal of hematology*. 2001;73(2):145-50. Epub 2001/05/25.

51. Carmeliet P, Collen D. Tissue factor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30(6):661-7. Epub 1998/08/08.
52. Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The pleiotropic effects of tissue factor: a possible role for factor VIIa-induced intracellular signalling? *Thrombosis and haemostasis*. 2001;86(6):1353-9. Epub 2002/01/05.
53. Versteeg HH, Ruf W. Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2006;32(1):24-32. Epub 2006/02/16.
54. Albrektsen T, Sorensen BB, Hjorto GM, Fleckner J, Rao LV, Petersen LC. Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(8):1588-97. Epub 2007/05/02.
55. Rao B, Gao Y, Huang J, Gao X, Fu X, Huang M, et al. Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. *International journal of colorectal disease*. 2011;26(5):593-601. Epub 2011/03/16.
56. van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, Versteeg HH. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood*. 2012;119(4):924-32. Epub 2011/11/09.
57. Mackman N. Protease inhibitors block lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in human monocytic cells by preventing activation of c-Rel/p65 heterodimers. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(42):26363-7. Epub 1994/10/21.
58. Kato S, Pinto M, Carvajal A, Espinoza N, Monso C, Bravo L, et al. Tissue factor is regulated by epidermal growth factor in normal and malignant human endometrial epithelial cells. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;94(2):444-53. Epub 2005/08/23.
59. Milsom CC, Yu JL, Mackman N, Micallef J, Anderson GM, Guha A, et al. Tissue factor regulation by epidermal growth factor receptor and epithelial-to-mesenchymal transitions: effect on tumor initiation and angiogenesis. *Cancer research*. 2008;68(24):10068-76. Epub 2008/12/17.
60. Provencal M, Berger-Thibault N, Labbe D, Veitch R, Boivin D, Rivard GE, et al. Tissue factor mediates the HGF/Met-induced anti-apoptotic pathway in DAOY medulloblastoma cells. *Journal of neuro-oncology*. 2010;97(3):365-72. Epub 2009/11/19.
61. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010;468(7325):829-33. Epub 2010/11/26.
62. Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer research*. 2005;65(4):1406-13. Epub 2005/03/01.
63. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *American journal of hematology*. 2002;69(4):247-54. Epub 2002/03/29.
64. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, Francis CW, Hruban RH, Hu YC, et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(10):2870-5. Epub 2007/05/17.
65. de Meis E, Azambuja D, Ayres-Silva JP, Zamboni M, Pinheiro VR, Levy RA, et al. Increased expression of tissue factor and protease-activated receptor-1 does not

- correlate with thrombosis in human lung adenocarcinoma. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2010;43(4):403-8. Epub 2010/05/07.
66. Sawada M, Miyake S, Ohdama S, Matsubara O, Masuda S, Yakumaru K, et al. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *British journal of cancer*. 1999;79(3-4):472-7. Epub 1999/02/23.
67. Chen L, Luo G, Tan Y, Wei J, Wu C, Zheng L, et al. Immunolocalisation of tissue factor in esophageal cancer is correlated with intratumoral angiogenesis and prognosis of the patient. *Acta histochemica*. 2010;112(3):233-9. Epub 2009/05/12.
68. Yamashita H, Kitayama J, Ishikawa M, Nagawa H. Tissue factor expression is a clinical indicator of lymphatic metastasis and poor prognosis in gastric cancer with intestinal phenotype. *J Surg Oncol*. 2007;95(4):324-31. Epub 2006/10/27.
69. Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(14):5339-45. Epub 2003/11/14.
70. Sturm U, Luther T, Albrecht S, Flossel C, Grossmann H, Muller M. Immunohistological detection of tissue factor in normal and abnormal human mammary glands using monoclonal antibodies. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1992;421(2):79-86. Epub 1992/01/01.
71. Ryden L, Grabau D, Schaffner F, Jonsson PE, Ruf W, Belting M. Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;126(10):2330-40. Epub 2009/10/02.
72. Kageshita T, Funasaka Y, Ichihashi M, Wakamatsu K, Ito S, Ono T. Tissue factor expression and serum level in patients with melanoma does not correlate with disease progression. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2001;14(3):195-200. Epub 2001/07/04.
73. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Human pathology*. 2000;31(4):443-7. Epub 2000/05/23.
74. Patry G, Hovington H, Larue H, Harel F, Fradet Y, Lacombe L. Tissue factor expression correlates with disease-specific survival in patients with node-negative muscle-invasive bladder cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;122(7):1592-7. Epub 2007/12/07.
75. Maciel EO, Carvalhal GF, da Silva VD, Batista EL, Jr., Garicochea B. Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. *The Journal of urology*. 2009;182(4):1594-9. Epub 2009/08/18.
76. Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2008;34(5):587-91; discussion 91-3. Epub 2008/11/07.
77. Lucky MA, Rogers B, Parr NJ. Referrals into a dedicated British penile cancer centre and sources of possible delay. *Sexually transmitted infections*. 2009;85(7):527-30. Epub 2009/07/09.
78. Romero FR, Romero KR, Mattos MA, Garcia CR, Fernandes Rde C, Perez MD. Sexual function after partial penectomy for penile cancer. *Urology*. 2005;66(6):1292-5. Epub 2005/12/20.

79. Opjordsmoen S, Waehre H, Aass N, Fossa SD. Sexuality in patients treated for penile cancer: patients' experience and doctors' judgement. *British journal of urology*. 1994;73(5):554-60. Epub 1994/05/01.
80. Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987;295(6609):1306-8. Epub 1987/11/21.
81. Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a population-based case-control study in Los Angeles County (United States). *Cancer causes & control : CCC*. 2001;12(3):267-77. Epub 2001/06/19.
82. Spiess PE, Horenblas S, Pagliaro LC, Biagioli MC, Crook J, Clark PE, et al. Current concepts in penile cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2013;11(5):617-24. Epub 2013/05/15.
83. Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2003;29(5):417-22. Epub 2003/06/12.
84. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood*. 2007;110(1):133-41. Epub 2007/03/21.
85. Kocaturk B, Versteeg HH. Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win. *Thrombosis research*. 2012;129 Suppl 1:S69-75. Epub 2012/06/15.
86. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer*. 1996;77(9):1877-83. Epub 1996/05/01.
87. A. T. Phlegmatia alba dolens. . *Clinique Medicale de l'Hotel - Dieu de Paris* 1865 3654-712.

ANEXOS

Anexo A Aprovação da Comissão Científica da FAMED e HSL-PUCRS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 02 de outubro de 2013.

Senhor (a) Pesquisador(a)

A Comissão Científica da Faculdade de Medicina e do Hospital São Lucas da PUCRS aprovou o trabalho intitulado "Avaliação da expressão imunohistoquímica do fator tecidual (FT) e densidade microvascular no carcinoma de pênis."

O relato de caso, assim como todos os documentos que o acompanharam, os quais receberam a presente aprovação, devem ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa/PUCRS, na mesma versão apresentada a esta Comissão.

Atenciosamente,

Profª Dra Bartira E. Pinheiro da Costa
Coordenador da Comissão Científica
FAMED-HSL/PUCRS

Ao Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal
Professor orientador e responsável pelo projeto na Instituição.

PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA - HSL/PUCRS
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3304 - Fax (51) 3320-3040
E-mail: nuclem@pucrs.br

Anexo B Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado "Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator tecidual no carcinoma de pênis", projeto vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Cirúrgica, realizado pelo pesquisador responsável Gustavo Franco Carvalho e o aluno de mestrado Carlos Eduardo Schio Fay, no Hospital São Lucas da PUCRS. O principal objetivo desta pesquisa é avaliar a presença do Fator Tecidual, uma proteína que pode ser encontrada em maior quantidade em tecidos com neoplasia e indicar uma maior agressividade do tumor.

Declaro que fui informado e orientado pessoalmente a respeito dos objetivos e da forma como o presente será realizado, concordando que a equipe colete os dados no prontuário e utilize pequeno fragmento do tumor de pênis para análise do Fator Tecidual, desde que não comprometa uma futura análise da neoplasia.

Declaro também, que minha participação é voluntária e terei garantia de sigilo e privacidade quanto às informações fornecidas por mim.

Caso não deseje participar da pesquisa ou resolva deixar de participar a qualquer momento não sofrerei qualquer tipo de prejuízo ou discriminação.

Autorizo a análise dos dados fornecidos e seu aproveitamento em apresentações e publicações médico-científicas.

Uma cópia deste termo será entregue ao senhor(a), na íntegra, devidamente assinado.

Para qualquer dúvida ou esclarecimento, entrar em contato diretamente com os pesquisadores Dr. Gustavo Carvalho e Dr. Carlos Eduardo Schio Fay, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS pelo telefone 33203345.

Participante

Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalho

Dr. Carlos Eduardo Schio Fay

Porto Alegre, _____ de _____ de 201...

Anexo D Protocolo de Coleta de Dados

Nome (Iniciais): _____

Prontuário.....

Telefone _____

Endereço de contato _____

Data cirurgia: ____/____/____

Data nascimento ____/____/____

Idade: _____ anos

Cor _____

Tabagismo ()SIM ()NÃO ()Informação Indisponível

Tumor Pênis ()Ta ()T1a ()T1b ()T2 ()T3 ()T4

Linfonodos N clínico ()Nx ()N0 ()N1 ()N2 ()N3

Linfadenectomia Inguinal ()SIM ()NÃO

Linfonodos N patológico ()Nx ()N0 ()N1 ()N2 ()N3

Grau diferenciação Tumoral ()G1 ()G2 ()G3 ()G4

AP _____

Número da Lâmina _____

Penectomia () Total () Parcial

Última Consulta Revisão _____

Óbito ()SIM ()NÃO Data do óbito ____/____/____

Relacionado ao CaPênis ()SIM ()NÃO

Anexo E Artigo Científico

The Journal of Urology
Tissue Factor Expression in Human Penile Cancer
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JU-14-127
Full Title:	Tissue Factor Expression in Human Penile Cancer
Article Type:	Investigative Urology Article
Keywords:	penile cancer, tissue factor, immunohistochemistry, prognosis
Corresponding Author:	Carlos Eduardo Schio Fay, M.D. Pontifícia Universidade Católica Porto Alegre, RS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Pontifícia Universidade Católica
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Carlos Eduardo Schio Fay, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Carlos Eduardo Schio Fay, M.D. Vinícius Duval Da Silva, M.D., Ph. D. Gustavo Franco Carvalhal, M.D., Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Purpose: Increased expression of tissue factor (TF) was correlated with worse prognosis and survival in various malignant neoplasms. In urologic tumors, it was studied in prostate, bladder and kidney cancers. The present study evaluates the immunohistochemical expression of TF in human penile cancer, correlating it with prognostic factors and survival.</p> <p>Materials and Methods: A total of 34 patients were treated by partial or total penectomy for penile carcinoma at our institution from January 1998 to December 2012. The immunohistochemical expression of TF was determined by a quantitative methodology in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples and correlated with age, clinical stage, pathologic stage, lymph node metastases, tumor grade and survival.</p> <p>Results: Immunohistochemical expression of TF was observed in 26/34 (76.4%) specimens. The mean area of TF expression in the samples was 27.82 μm^2 [95% CI 20.0 - 35.6, SD 22.4]. Mean age was significantly lower among patients with increased TF expression in comparison to those with lower TF expression (57.6 vs. 67.3 years; $p = 0.047$). Mean postoperative follow-up was 28.3 months (from 0 to 139.6 months). There were eight deaths (23.5%), four in each group, all related to the penile cancer. In multivariate analyses, there was no statistically significant correlation between TF expression and the study variables.</p> <p>Conclusions: TF was expressed in most samples of penile cancers. There was no statistically significant correlation between TF expression, prognostic factors and survival.</p>
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	

Tissue Factor Expression in Human Penile Cancer

Carlos Eduardo S. Fay, Vinicius D. da Silva, Gustavo F. Carvalhal

From the Departments of Urology (CESF, GFC) and Pathology (VDS), School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence: 910 Ramiro Barcelos Street, room 1002, Porto Alegre, Brazil, ZIP 90035-001, Phone: +55 51 33117975; Fax: + 55 51 33114902; email:cfay@bol.com.br)

Key Words: penile cancer, tissue factor, immunohistochemistry, prognosis

Abstract

Purpose: Increased expression of tissue factor (TF) was correlated with worse prognosis and survival in various malignant neoplasms. In urologic tumors, it was studied in prostate, bladder and kidney cancers. The present study evaluates the immunohistochemical expression of TF in human penile cancer, correlating it with prognostic factors and survival.

Materials and Methods: A total of 34 patients were treated by partial or total penectomy for penile carcinoma at our institution from January 1998 to December 2012. The immunohistochemical expression of TF was determined by a quantitative methodology in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples and correlated with age, clinical stage, pathologic stage, lymph node metastases, tumor grade and survival.

Results: Immunohistochemical expression of TF was observed in 26/34 (76.4%) specimens. The mean area of TF expression in the samples was $27.82 \mu\text{m}^2$ [95% CI 20.0 – 35.6, SD 22.4]. Mean age was significantly lower among patients with increased TF expression in comparison to those with lower TF expression (57.6 vs. 67.3 years; $p = 0.047$). Mean postoperative follow-up was 28.3 months (from 0 to 139.6 months). There were eight deaths (23.5%), four in each group, all related to the penile cancer. In multivariate analyses, there was no statistically significant correlation between TF expression and the study variables.

Conclusions: TF was expressed in most samples of penile cancers. There was no statistically significant correlation between TF expression, prognostic factors and survival.

INTRODUCTION

Penile cancer is rare in developed countries, being associated with poor socioeconomic conditions. Its incidence varies according to habits of personal hygiene, circumcision, promiscuity, human papillomavirus (HPV) infections and smoking. [1] In the U.S., penile carcinomas correspond to 0.1% of all malignant neoplasms in males, with estimates of 1,570 new cases and 310 cancer-specific deaths for 2013. [2,3] However, in some underdeveloped countries it is more common than other urologic tumors, corresponding to up to 10-20% of male cancers. [4,5] Roughly 95% of the malignant tumors of the penis are squamous cell carcinomas, usually occurring in men of low socioeconomic status, during the sixth or seventh decades of life. These tumors spread to the inguinal and pelvic lymph nodes via the lymphatic system and via haematogenous spread to distant organs such as lungs, liver, bones and brain. [6,7] Surgery is the mainstay of treatment and may include penile preservation techniques, partial or total penectomy, and inguinal or pelvic lymphadenectomies.

The association between cancer and coagulation disorders is well known since the description of Trousseau's syndrome. [8] Up to 90% of cancer patients present some form of coagulation disorder, of which deep venous thrombosis and pulmonary embolism are the most severe consequences. Tissue factor (TF), also known as thromboplastin, is a glycoprotein that activates the extrinsic coagulation pathway serving as a cofactor for the activated Factor VII (FVIIa); the resulting complex TF-FVIIa activates factors IX and X, which finally lead to the conversion of fibrinogen into fibrin and clot formation. [9] The interaction of TF with FVIIa also results in a series of signaling events that regulate cellular responses necessary for gene transcription and cell survival. [10] Increased expression of TF by tumor cells seems to have a pivotal role not only in the thromboembolic events associated with cancer but also in the processes of tumor growth, invasion and metastases. [11] Increased TF expression has been

described in a variety of tumors (breast [12], lung [13], esophagus [14], stomach [15], pancreas [16], colon [17], liver [18], bladder [19], kidney [20], prostate [21], skin [22], central nervous system [23]), often correlated with worse prognosis. We evaluated TF expression in human penile carcinomas, and correlated it with prognostic factors and survival.

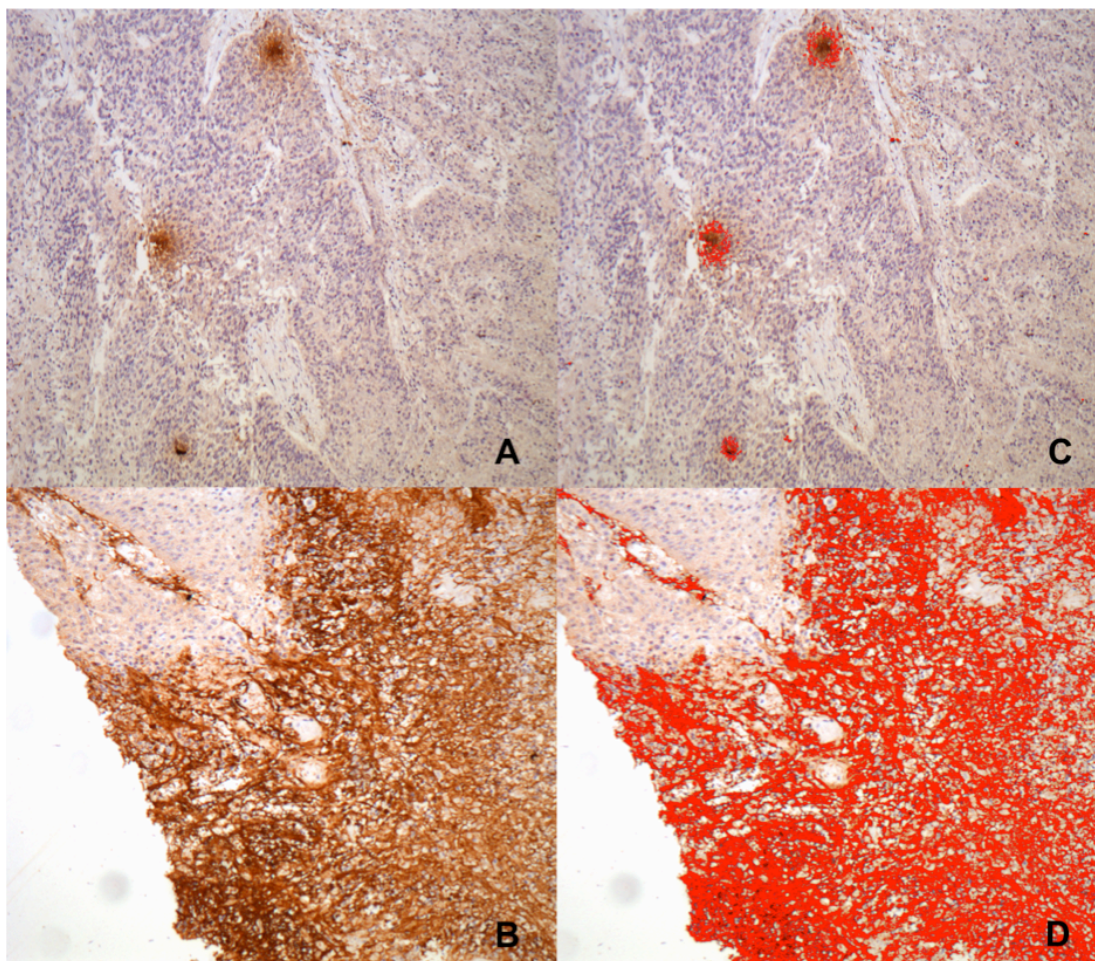
MATERIALS AND METHODS

We reviewed the records of 37 patients with penile cancer treated with either partial or total penectomy from January 1997 to December 2012 at a university hospital in southern Brazil. Of these, three patients were excluded from the analysis because paraffin blocks were unavailable. Our final study group thus consisted of 34 patients. We created a database with the following variables: patients' age at surgery, TNM stage, tumor grade, presence of positive nodes, and TF expression on immunohistochemistry. Overall survival was the main outcome measure. Patients' age at the time of diagnosis was registered in months and years. For statistical analysis, we considered three months as 0.25, six months as 0.50, and nine months as 0.75 years. The histological criteria and the staging system used were those proposed by the 2010 edition of the AJCC TNM staging manual. [24] Clinical, pathological, and follow up data was obtained through chart reviews and, whenever required, telephone contacts or active residence search. The same pathologist (VDS) reviewed all conventional pathology slides. The attending surgeon determined the surgical approach (partial or total penectomy) for each case.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. Five-micron sections were cut onto coated slides and deparaffinated by routine technique. Analysis of TF expression was performed in a blinded manner, using a Zeiss Axioskop 40[®] (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) optical microscope at a magnification of 100X and Image Pro Plus 4.5.1[®] image analysis software (Media Cybernetics, Rockville, U.S.A.). Samples of prostate carcinoma were used as positive and negative controls of TF expression. Immunohistochemical expression of TF was evaluated with a quantitative methodology, selecting and digitizing microscopic fields where there was positive staining at 100X magnification without imaging superposition. The number of images selected for each case varied from one to five. Each image file had a total area of 361.9 μm^2 . In all images captured, analyses were performed with a 24-bit color selection method, with the creation of RGB color reference files, which were applied to all images to define the measurement area, as shown in figure 1. Results were expressed in μm^2 . We defined high or low immunohistochemical expression of TF according to the median of the areas measured in all cases. Two independent observers agreed with the selection process of the areas examined in all cases.

Figure 1. Staining for TF in human penile carcinoma. A. Low intensity staining for TF; B. High intensity staining for TF; C and D images captured with 24 bit select colors (RGB) both in low and high intensity staining for TF. Selected areas are marked in red. Reduced from X100.



Statistical Analysis and Ethics

Continuous data were described using mean and standard deviation. For asymmetric data we used median and inter-quartile range. Categorical data were expressed using counts and percentages. Baseline features were compared using Student's t test for continuous data and chi-square tests for categorical data. A survival analysis was conducted using Kaplan-Meier method followed by log rank test for comparison between groups. A multivariate analysis based on the Cox regression model was used to adjust for confounding ($p < 0.05$). Data were analyzed using SPSS version 18.0[®]. The study protocol was reviewed and approved by Institutional Review Board and by the Ethics Committee of the University Hospital.

RESULTS

Conventional histology confirmed squamous cell carcinoma in all 34 cases. In 26/34 cases (76.4%) there was positive expression of TF, whereas in 8/34 cases (23.6%) expression of TF was negative. The mean area of expression was $27.8 \mu\text{m}^2$ [95%CI 20.0 – 35.6; SD 22.4]. The median area was $27.8 \mu\text{m}^2$. Figure 2 shows sample distribution of TF expression, with the minimum and maximum values, the median, and the 25 and 75 percentiles.

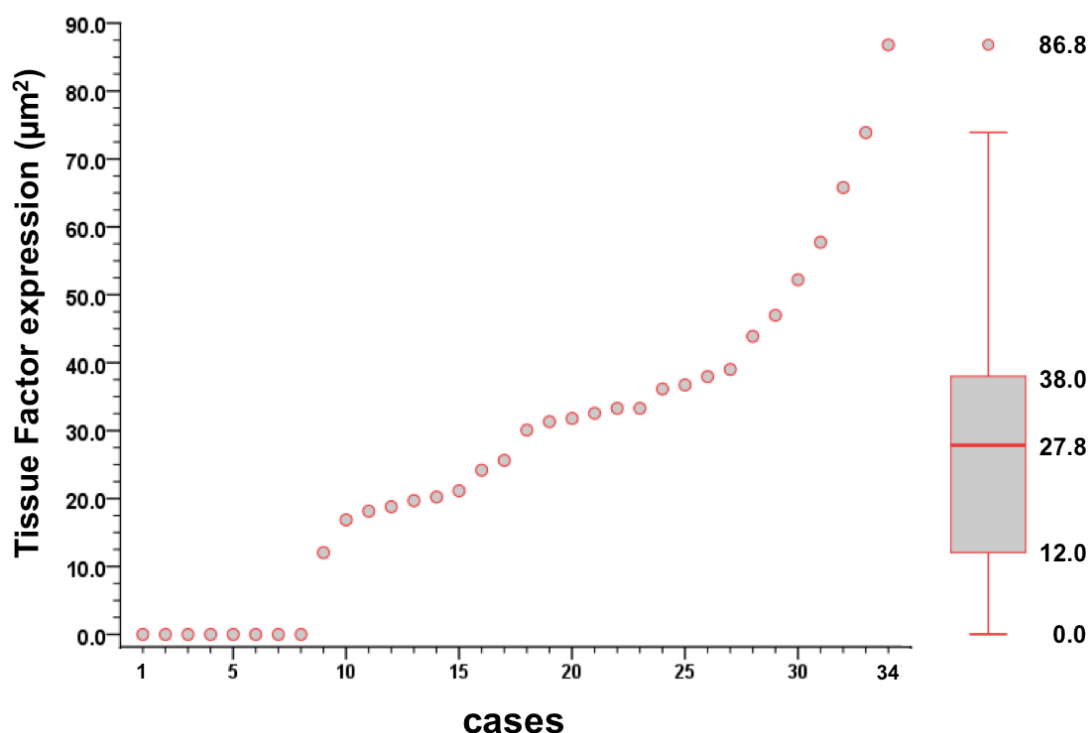


Figure 2. Sample distribution of TF expression.

According to the median, we have divided the sample into two groups, one with TF expression area $\geq 28 \mu\text{m}^2$ (high expression) and another with TF expression area $< 28 \mu\text{m}^2$ (low expression) each with 17 patients. This cutoff point was used to correlate TF expression with patient's age, T stage, lymph node positivity, tumor grade, clinical and pathological

TNM stage, and death.

Patients' mean age was 62.5 years (42.2 to 91.7 years). The group of patients with high TF expression was significantly younger than the group of patients with low TF expression (57.6 vs. 67.3 years; $p = 0.047$).

As to race, 33 patients (97.0%) were white, and one patient was black (3.0%). The black patient presented an area of TF of $83 \mu\text{m}^2$, and a Grade 2, T3N0M0 tumor. Race was not included in the analyses due to the impossibility to adequately evaluate this variable with only one patient in the subgroup.

Twenty-one patients (61.8%) were treated with partial penectomy, while 13 patients were treated with total penectomy (38.2%). There was no difference in TF expression according to the type of penectomy.

Of all 34 tumors, 16 (47.1%) extended to the sub-epithelial connective tissue (T1), 6 (17.6%) to the *corpus spongiosum* and/or *corpora cavernosa* (T2), and 12 (35.3%) extended to the urethra (T3). No tumor had extended to other adjacent structures, such as the prostate or the pubis (T4). Additionally, there was no tumor with extension restricted to the subepithelial tissue (Ta).

Regarding tumor grade, 14 (41.2%) were well differentiated, 19 (55.9%) were moderately differentiated, and 1 (2.9%) was poorly differentiated. There was no statistically significant difference between tumor grade and TF expression.

Of the 34 patients, 12 (35.3%) were submitted to bilateral inguinal lymphadenectomy. Of these, five patients had positive lymph nodes, while 7 patients had negative nodes. There was no difference in TF expression between the groups with positive or negative lymph nodes.

Table 1 shows that excepting age, no baseline clinical or pathological variable was statistically associated with TF expression.

Table 1. Baseline characteristics and Tissue Factor expression.

Characteristic	Total n = 34	TF expression (μm^2)		P Value
		TF \geq 28 n = 17	TF < 28 n = 17	
Age, years	62 \pm 14	58 \pm 10	67 \pm 16	0.047 ^a
T Stage, n ^o (%)				0.63 ^b
T1a	14 (41.2)	5 (29.4)	9 (52.9)	
T1b	2 (5.9)	1 (5.9)	1 (5.9)	
T2	6 (17.6)	4 (23.5)	2 (11.8)	
T3	12 (35.3)	7 (41.2)	5 (29.4)	
cN Stage, n ^o (%)				0.76 ^b
cN0	23 (67.6)	11 (64.7)	12 (70.6)	
cN1	-	-	-	
cN2	8 (23.5)	5 (29.4)	3 (17.6)	
cN3	3 (8.8)	1 (5.9)	2 (11.8)	
pN Stage, n (%)				0.58 ^b
pNx	22 (64.7)	9 (52.9)	13 (76.4)	
pN0	7 (20.6)	5 (29.4)	2 (11.8)	
pN1	-	-	-	
pN2	4 (11.8)	3 (17.7)	1 (5.9)	
pN3	1 (2.9)	-	1 (5.9)	
Clinical Stage, n ^o (%)				0.80 ^b
I	10 (29.4)	4 (23.5)	6 (35.3)	
II	13 (38.2)	7 (41.2)	6 (35.3)	
IIIa	-	-	-	
IIIb	8 (23.5)	5 (29.4)	3 (17.6)	
IV	3 (8.8)	1 (5.9)	2 (11.8)	
Histologic Grade				>0.99 ^b
G1	14 (41.2)	7 (41.2)	7 (41.2)	
G2	19 (55.9)	9 (52.9)	10 (58.8)	
G3	1 (2.9)	1 (5.9)	-	
G4	-	-	-	
Penectomy, n ^o (%)				0.16 ^b
Partial	21 (61.8)	8 (47.1)	13 (76.5)	
Total	13 (38.2)	9 (52.9)	4 (23.5)	

Data reported as mean \pm standard deviation or counts (percentages); TF: tissue factor; p: statistical significance according to a:Student's t test or b:Fisher's exact test.

Mean follow-up was 28.3 months (0 to 139.6 months). There were eight deaths during follow-up (23.5%), four in each group, all related to the neoplasm. There was no difference in

mortality according to high or low TF expression. Table 2 summarizes the KM results at 24, 36, and 60 months.

Table 2. Deaths according to TF low and high expression and KM overall survival.

Table 2 – Deaths according to TF low and high expression and KM survival.				
Characteristic	Total n = 34	TF expression (μm^2)		P value
		TF \geq 28 n = 17	TF < 28 n = 17	
Death				
events, n ^o (%)	8 (23.5)	4 (23.5)	4 (23.5)	>0.99 ^a
KM rate (%)				0.50^b
24 months	78.6	75.5	80.8	
36 months	71.5	75.5	69.3	
60 months	55.6	50.3	57.7	

Data reported counts (percentages); TF: tissue factor; KM: Kaplan-Meier; p: statistical significance according to a: Fisher's exact test; b: log-rank test

Overall survival estimated by Kaplan-Meier was of 102.8 months (95%CI: 69.0 – 136.7). In the men with high TF expression KM survival was 57.7 months (95%CI: 30.6 – 84.7) whereas in the men with low TF expression survival was of 107.3 months (95%CI: 64.2 – 150.4). There was no statistically significant difference in survival according to high or low expression of TF.

Figure 3. Overall survival.

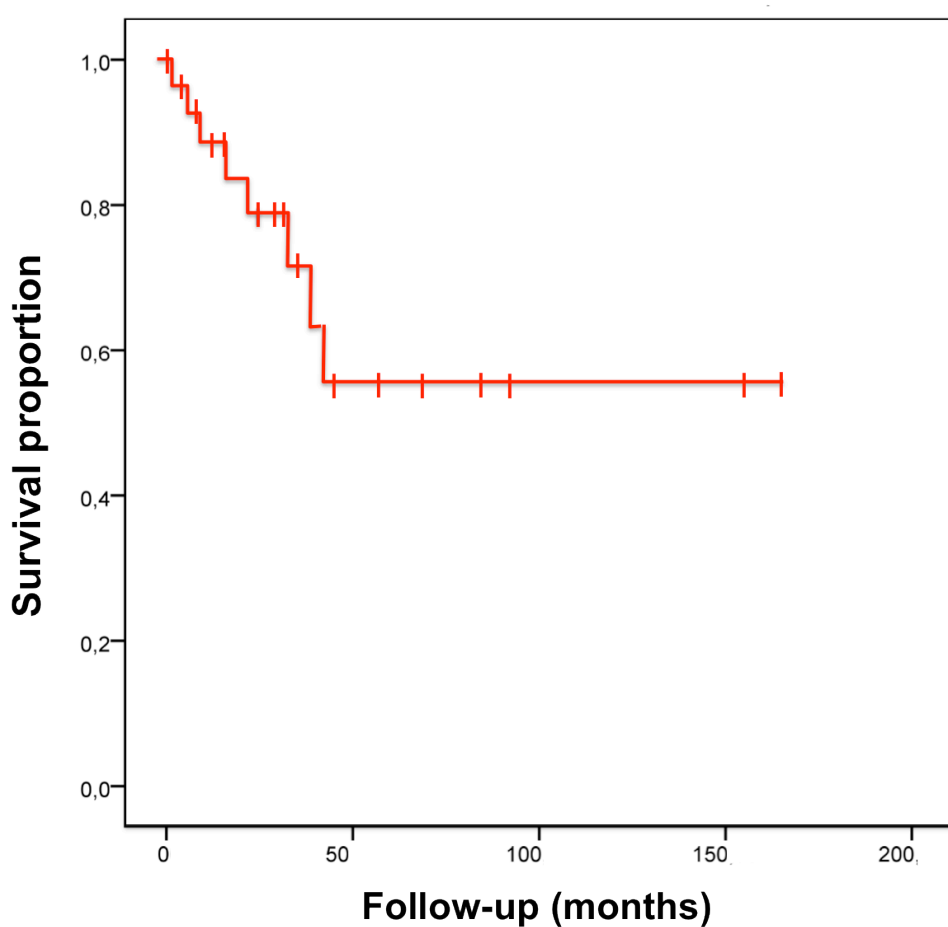
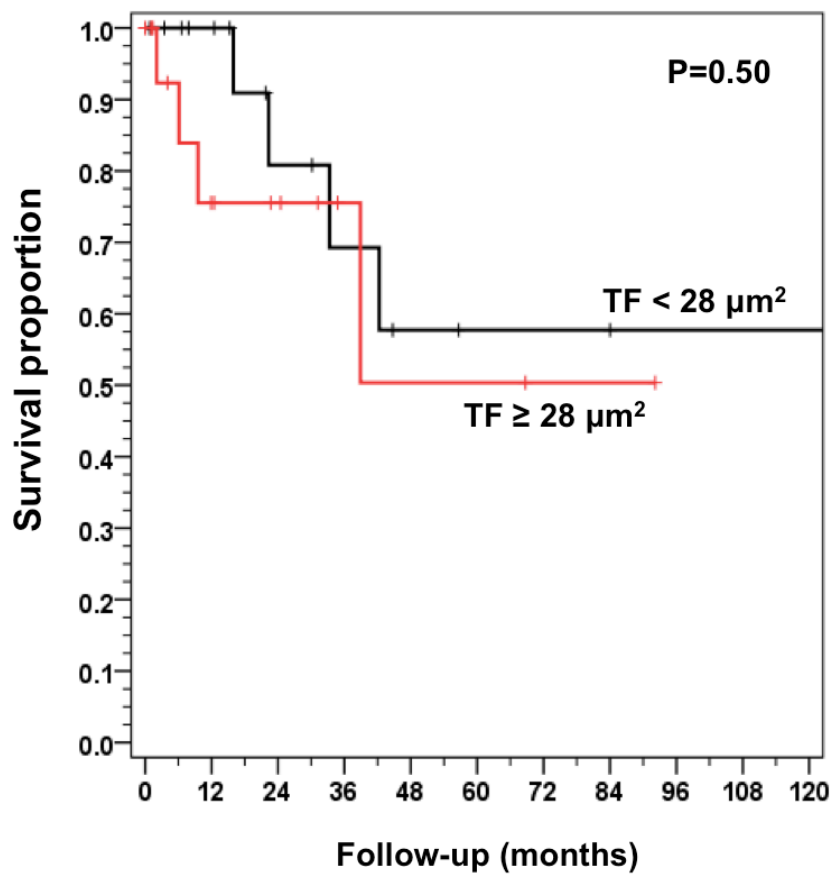
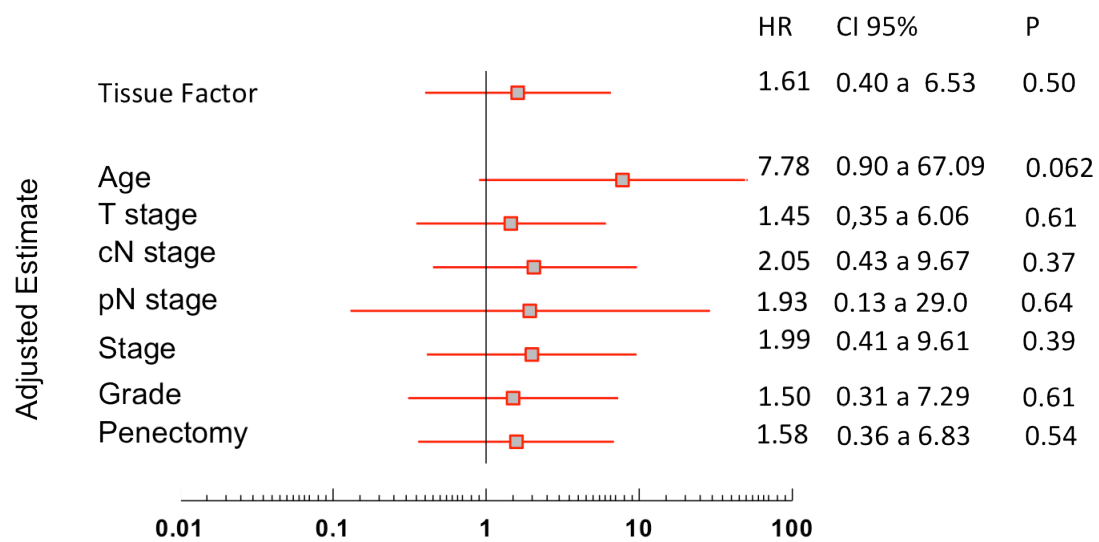


Figure 4. Overall survival, stratified by high or low TF expression.



We examined the correlations between the groups of TF expression and other variables using a Cox regression model (figure 5). There was no statistically significant correlation between TF expression and the other prognostic factors. A high TF expression showed a trend towards statistical significance after adjusting for age (HR 7.78; 95%CI: 0.9 to 67.1; $p=0.062$).

Figure 5. Multivariate analysis (Cox regression model).



DISCUSSION

It is currently believed that TF expression may contribute to the tumor derived pro-coagulant activity, and that thrombin and other products of the coagulation cascade may influence the development of metastases. [11] The formation of fibrin around metastatic tumor cells, for example, may protect these from the action of cells from the immune system. In an experimental mice model with intravenous injection of TF positive fibrosarcoma cells, there was failure in the development of metastases in mice that were fibrinogen deficient. Apparently, there is also a role for TF in tumor growth, related to an increase in tumor angiogenesis, as suggested by experimental studies. [25]

In most clinical studies in humans, the expression of TF was evaluated as a possible prognostic factor of cancer recurrence or death. In some studies it was considered an independent predictor of mortality, whereas in others not. In 67 prostate carcinomas, Abdulkadir et al. have found an increased expression of TF in 73% of the tumors, and a positive correlation between the immunohistochemical expression of TF, tumor angiogenesis (microvessel density) and preoperative PSA levels. [21] Likewise, Patry et al. described an increased expression of TF in 77.6% of the samples of muscle-invasive bladder cancers of 218 patients. During follow-up, 45.4% of the patients progressed to death after primary treatment; in the patients with negative lymph nodes, those with positive expression for TF had a significantly shorter cancer specific survival, with a 3.15 times greater risk of dying from bladder cancer. [19] Studying 41 patients with nephroblastoma, Maciel et al. described a positive immunohistochemical expression of TF in 88.3%. In that study, increased expression of TF was the most important independent predictor for tumor recurrence and mortality both in the univariate and in the multivariate analyses. [20] In a study with 86 patients with melanoma, Kageshita et al. showed that 83 (96.5%) patients expressed TF in their tumors, but there was no association of increased TF expression and disease progression. [22] More

recently, two isoforms of TF were described, asTF and TF-A, and were also found to be overexpressed in cancer samples. More specifically, the expression of asTF was described in samples of gliomas, gastric carcinomas, colorectal carcinomas, non-small cell lung cancers and melanomas. [26] However, the role of these TF isoforms in cancer progression and thrombosis remain under investigation.

We have studied 34 men with penile squamous cell carcinomas, and showed that in these tumors there was immunohistochemical expression of TF in 76%. To our knowledge, this is the first report of TF expression in penile cancer, which limits our capacity to compare our findings with those of other groups. Nonetheless, the finding is consistent with the immunohistochemical expression of TF in other urologic tumors, such as prostate adenocarcinomas, bladder transitional cell carcinomas and kidney nephroblastomas. The fact that penile carcinomas are rare in the Northern hemisphere may contribute to the paucity of publications regarding TF and penile cancers so far, in comparison to other malignant neoplasms. We did not find a role for increased TF expression as a prognostic factor in our study, but this may be partly due to the small sample size (34 patients). In the multivariate analyses, adjusting for confounding factors we have found a non-statistically significant trend towards increased mortality among younger men with increased TF expression.

Patients with penile carcinomas tend to present at an age range of 50 to 70 years Ref 14. In our study, mean age at presentation was 62 years (range 42 to 91 years). However, due to its etiological relationship with human papillomavirus (HPV) infection, penile carcinomas may occur among younger men. In our sample, 15% of the men presented with age less than 45 years. In a Brazilian study, Favorito et al. reported 7.4% of the patients aged less than 35 years old. [27] These findings corroborate the possibility of such disease among younger men with penile lesions. In the published series of penile carcinomas, a large proportion of men present with primary lesions of stage T2 or greater, with invasion of the *corpora cavernosa*,

glands, *corpus spongiosum* or urethra (47-58%). [7] Accordingly, in our series, 53% of men had lesions \geq T2. Locally advanced lesions are correlated with tissue invasion, loco-regional metastases, systemic disease and worse survival. A possible explanation for the large proportion of men with advanced T stage could be the difficult access to the public medical system in our environment, a common issue in underdeveloped or developing countries. However, there may be other factors, such as lack of information or shame that may be responsible for the delayed medical attention. In a British study, Lucky et al. evaluated 100 men seen from 2002 to 2007 at a regional reference center for penile cancer treatment in the UK. These authors found that the approximated time interval between the beginning of symptoms and the search for medical attention varied from two days to 24 months, with a mean of 5.8 months. The greatest factor causing the delay in receiving medical attention in their series was patient reluctance in seeking care. [28]

The treatment of the primary lesion in penile carcinomas depends on a variety of factors, namely tumor size and location, pathologic findings and the possibility of achieving negative margins while still maintaining an adequate penile shaft for comfortable micturition. Partial or total penectomies remain the gold standards of surgical treatment, with very low local recurrence rates (0-8%). [29] In our series, similarly to those reported in the literature, most primary lesions were treated with partial penectomies, mainly due to the advanced local stage at presentation and to the more distal location of most lesions. The impact of these surgeries on the quality of life of patients, which was not evaluated in our retrospective study, cannot be underestimated, since most men are potent at the time of diagnosis.

Traditionally, the most important prognostic factor in penile carcinomas is the involvement of inguinal lymph nodes. The phase of locoregional growth is usually prolonged before distant metastases, and inguinal lymphadenectomy can be curative in many cases (40-

50%). Ravi et al. reported a five-year cancer specific survival of 77% for patients with 1-3 positive inguinal lymph nodes, 8.4% for patients with 4-5 positive lymph nodes and 0% for men with more than 5 positive lymph nodes. Untreated patients with lymph node metastases generally survive 2-3 years. [30] In our study, five-year overall survival estimate in the KM analyses was of 55.6%, and was not different according to high or low TF expression (50.3 vs 57.7 %; NS). In comparison to the survival of the published series, our survival results are explained by to the high proportion of patients in our series with more advanced disease (T2 or greater, 52.9%), and to the prevalence of positive lymph nodes in the pathologic report (N+, 14.7%).

Our study has several limitations. Firstly, it was a retrospective study, with the inherent problems of data collection in hospital charts and of paraffin embedded tissue. Secondly, although studies have shown reasonable concordance rates in the analyses of expression of other biomarkers in tissue samples vs. whole-mounted paraffin embedded specimens, the technique of immunohistochemistry in selected tissue samples may have underestimated or overestimated the actual expression of TF, especially in tumors with focal expression.[19] Thirdly, immunohistochemistry has been criticized due to the lack of objectivity in its qualitative analyses. Most studies utilize a graded score for TF expression based on the percentage of intensely staining tumor cells. Our study was based in a semi-quantitative methodology, with a computerized software for image analyses aiming to reduce biases and subjectivity in the process. Nevertheless, the choice of the most representative areas of TF expression in the tumor, in spite of being made with the agreement of two independent trained colleagues, remains a non-objective factor. Lastly, the small number of patients in the study may limit the capacity to make strong assumptions regarding TF as a prognostic factor in penile cancer.

CONCLUSION

TF was expressed in most samples of penile cancers. There was no statistically significant correlation between TF expression, prognostic factors and survival. Further studies are necessary to better evaluate the significance of this marker as a potential prognostic factor and therapeutic target in penile carcinomas.

REFERENCES

1. Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *The lancet oncology*. 2004;5(4):240-7. Epub 2004/03/31.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(1):11-30. Epub 2013/01/22.
3. Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, Giuliano A, Goodman MT, King JB, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003. *Cancer*. 2008;113(10 Suppl):2883-91. Epub 2008/11/05.
4. Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Penile cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006;54(3):369-91; quiz 91-4. Epub 2006/02/21.
5. Kamat MR KJ, Tongaonkar HB. . Carcinoma of the penis: the Indian experience. . *J Surg Oncol*. 1993;52:6.
6. Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H, et al. EAU penile cancer guidelines 2009. *European urology*. 2010;57(6):1002-12. Epub 2010/02/19.
7. Ficarra V, Akduman B, Bouchot O, Palou J, Tobias-Machado M. Prognostic factors in penile cancer. *Urology*. 2010;76(2 Suppl 1):S66-73. Epub 2010/08/19.
8. A. T. Phlegmatia alba dolens. . *Clinique Medicale de l'Hotel - Dieu de Paris 1865* 3654-712.
9. Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The pleiotropic effects of tissue factor: a possible role for factor VIIa-induced intracellular signalling? *Thrombosis and haemostasis*. 2001;86(6):1353-9. Epub 2002/01/05.
10. Carmeliet P, Collen D. Tissue factor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30(6):661-7. Epub 1998/08/08.
11. Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *International journal of hematology*. 2001;73(2):145-50. Epub 2001/05/25.
12. Sturm U, Luther T, Albrecht S, Flossel C, Grossmann H, Muller M. Immunohistological detection of tissue factor in normal and abnormal human mammary glands using monoclonal antibodies. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1992;421(2):79-86. Epub 1992/01/01.
13. Sawada M, Miyake S, Ohdama S, Matsubara O, Masuda S, Yakumaru K, et al. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *British journal of cancer*. 1999;79(3-4):472-7. Epub 1999/02/23.
14. Chen L, Luo G, Tan Y, Wei J, Wu C, Zheng L, et al. Immunolocalisation of tissue factor in esophageal cancer is correlated with intratumoral angiogenesis and prognosis of the patient. *Acta histochemica*. 2010;112(3):233-9. Epub 2009/05/12.

15. Yamashita H, Kitayama J, Ishikawa M, Nagawa H. Tissue factor expression is a clinical indicator of lymphatic metastasis and poor prognosis in gastric cancer with intestinal phenotype. *J Surg Oncol*. 2007;95(4):324-31. Epub 2006/10/27.
16. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, Francis CW, Hruban RH, Hu YC, et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(10):2870-5. Epub 2007/05/17.
17. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *American journal of hematology*. 2002;69(4):247-54. Epub 2002/03/29.
18. Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(14):5339-45. Epub 2003/11/14.
19. Patry G, Hovington H, Larue H, Harel F, Fradet Y, Lacombe L. Tissue factor expression correlates with disease-specific survival in patients with node-negative muscle-invasive bladder cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;122(7):1592-7. Epub 2007/12/07.
20. Maciel EO, Carvalhal GF, da Silva VD, Batista EL, Jr., Garicochea B. Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. *The Journal of urology*. 2009;182(4):1594-9. Epub 2009/08/18.
21. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Human pathology*. 2000;31(4):443-7. Epub 2000/05/23.
22. Kageshita T, Funasaka Y, Ichihashi M, Wakamatsu K, Ito S, Ono T. Tissue factor expression and serum level in patients with melanoma does not correlate with disease progression. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2001;14(3):195-200. Epub 2001/07/04.
23. Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer research*. 2005;65(4):1406-13. Epub 2005/03/01.
24. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010. xiv, 648 p. p.
25. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood*. 2007;110(1):133-41. Epub 2007/03/21.
26. Kocaturk B, Versteeg HH. Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win. *Thrombosis research*. 2012;129 Suppl 1:S69-75. Epub 2012/06/15.
27. Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2008;34(5):587-91; discussion 91-3. Epub 2008/11/07.
28. Lucky MA, Rogers B, Parr NJ. Referrals into a dedicated British penile cancer centre and sources of possible delay. *Sexually transmitted infections*. 2009;85(7):527-30. Epub 2009/07/09.
29. Horenblas S, van Tinteren H. Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. *The Journal of urology*. 1994;151(5):1239-43. Epub 1994/05/01.
30. Ravi R. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. *British journal of urology*. 1993;72(5 Pt 2):817-9. Epub 1993/11/01.