TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL EM PORTADORES DE CÂNCER DE PÊNIS SEM METÁSTASES LINFONODAIS

GIULIANO AMORIM AITA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Stenio de Cássio Zequi

Co-Orientador: Prof. Dr. Walter Henriques Da Costa

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

A311p Aita, Giuliano Amorim

Transição epitélio-mesenquimal em portadores de câncer de pênis sem metástases linfonodais. Giuliano Amorim Aita – São Paulo, 2022.

55p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Stenio de Cássio Zequi

Descritores: 1. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 2. Prognóstico/Prognosis. 3. Vimentina/Vimentin. 4. Imuno-histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Caderinas/ Cadherins. 6. Invasão Perineural/Perineural Invasion.

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

A Deus, por renovar as minhas forças e esperanças diariamente.

À Keyla pela parceria de vida ao longo destes anos e, acima de tudo, pelo amor que se (e nos) renova e revitaliza.

Aos meus amados filhos, Giovana, Eduardo (in memoriam) e Heitor que ressignificaram e ressignificam a minha vida.

Aos meus pais, Leonardo e Sônia, e aos meus irmãos, Alessandro e Daniele, pela dedicação e estímulo constante aos meus estudos.

Ao meu esforço, dedicação e comprometimento com este ofício e com a caminhada que escolhi trilhar. Não faltaram momentos de turbulência e instabilidade que precisaram ser superados com fé, determinação e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Stênio Zequi, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esta pesquisa e acima de tudo, por me permitir adentrar no mundo científico, mesmo estando geograficamente distante. Seu apoio, estímulo e receptividade foram essenciais. Serei eternamente grato.

À Dra. Stephania Bezerra, que dispensou seu tempo na preparação e leitura das lâminas e suportou a minha insistência com tantas indagações e solicitações.

À bibliotecária Suely Francisco, responsável pela formatação deste trabalho.

À estatística Janaina Naiara Germano, por todo o apoio e disponibilidade para a análise estatística deste estudo.

RESUMO

Aita GA. **Transição epitélio-mesenquimal em portadores de câncer de pênis sem metástases linfonodais**. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

Introdução: O carcinoma escamoso do pênis é uma neoplasia rara, mas sua incidência e mortalidade específica vêm aumentando. No Brasil, o câncer de pênis constitui 2,1% das neoplasias em homens. O acometimento dos linfonodos inguinais é o fator prognóstico mais importante. Comparados aos pacientes com linfonodos positivos, aqueles com linfonodos histologicamente negativos (pN0) têm o melhor prognóstico; entretanto, a ausência de metástases linfonodais não garante a cura, haja vista que uma proporção destes apresenta recorrência locorregional ou progressão tumoral após o tratamento. Poucos estudos examinaram populações de pacientes com pN0 ou clinicamente negativos (cN0). **Objetivos**: Avaliar o impacto da expressão imuno-histoquímica da E-caderina e da vimentina como fatores prognósticos para sobrevida global, sobrevida câncer específica e sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma escamoso do pênis clinicamente ou histologicamente negativos para metástase linfonodal. **Material e Métodos**: Coorte retrospectiva de 116 pacientes cN0 e pN0 com carcinoma escamoso do pênis consecutivamente tratados no A.C.Camargo Cancer Center entre 1953-2017. As variáveis registradas incluíram idade, estadiamento TNM, subtipo histológico, grau de diferenciação tumoral, invasão vascular microscópica, invasão perineural, padrão microscópico da fronte de invasão tumoral (expansivo/infiltrativo) e expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina e vimentina. As amostras de tumor foram analisadas no centro do tumor e na fronte de invasão tumoral. As análises de sobrevida foram realizadas usando curvas de Kaplan-Meier e testes de log-rank. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi usado para determinar quais variáveis influenciaram as taxas de sobrevida global, câncer específica e livre de doença. **Resultados**: O tempo de seguimento médio foi de 176 meses. A presença de invasão perineural foi associada à alta expressão de vimentina no centro tumoral (p = 0,013), à perda da expressão de E-caderina no centro do tumor (p = 0,026) e na fronte de invasão tumoral (p = 0,02). A perda da expressão imuno-histoquímica da E-caderina na fronte de invasão e a presença de invasão perineural foram independentemente associadas à sobrevida livre de doença. **Conclusões**: A

perda da expressão imuno-histoquímica da E-caderina na fronte de invasão tumoral e a presença de invasão perineural no tumor primário foram associadas a uma menor sobrevida livre de doença. Alta expressão de vimentina no centro do tumor, perda da expressão da E-caderina no centro do tumor e na fronte de invasão do tumor foram associadas à presença de invasão perineural no tumor primário.

Descritores: Neoplasias Penianas, Prognóstico, Vimentina, Caderinas, Imuno-histoquímica, Invasão Perineural

ABSTRACT

Aita GA. [**Epithelium-mesenchymal transition in penile cancer patients without lymph node metastases**]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

Introduction: Penile squamous cell carcinoma is a rare neoplasm, but its incidence and specific mortality have been increasing. In Brazil, penile squamous cell carcinoma constitutes 2.1% of neoplasms in men. The involvement of inguinal lymph nodes is the most important prognostic factor. Compared to patients with positive lymph nodes, histologically negative patients (pN0) have the best prognosis; however, the absence of lymph node metastases does not guarantee a cure. Some pN0 patients exhibit locoregional recurrence or tumor progression after treatment. Few studies have examined patient populations with histologically negative (pN0) or clinically negative (cN0) lymph nodes. **Objectives:** To evaluate the impact of E-cadherin and vimentin expression as prognostic factors for overall survival, cancer-specific survival, and disease-free survival in patients with penile squamous cell carcinoma who were clinically or histologically negative for lymph node metastasis. **Material and Methods:** Retrospective cohort of 116 patients (cN0 and pN0) treated at A. C. Camargo Cancer Center from 1953 to 2017. Recorded variables included age, TNM staging, histological subtype, degree of tumor differentiation, microscopic vascular invasion, perineural invasion, microscopic pattern of the tumor invasion front (pushing/infiltrating) and vimentin and E-cadherin immunohistochemical expression. Tumor samples were analyzed at the tumor center and at the tumor invasion front. Survival analyses were performed using Kaplan-Meier curves and log-rank testing. Cox's proportional hazards model was used to determine which variables influenced overall survival, disease-free survival, or cancer specific survival. **Results:** The median follow-up time was 176 months. Perineural invasion was associated with high vimentin expression at tumor center ($p = 0.013$), loss of E-cadherin expression in the tumor center ($p = 0.026$) and at the front invasion ($p = 0.02$). Loss of immunohistochemical E-cadherin expression at the front invasion and the presence of perineural were independently associated with disease-free survival. **Conclusions:** Lower disease-free survival was associated with loss of immunohistochemical E-cadherin expression at the tumor invasion front, and the presence of perineural invasion. High vimentin expression in the tumor center, loss of E-cadherin

expression in the tumor center and in the tumor invasion front were associated with the presence of perineural invasion in the primary tumor.

Key Words: Penile Cancer, Vimentin, E-Cadherin, Immunohistochemistry, Prognostic Factors, Perineural Invasion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Seleção da população de estudo e disponibilidade de blocos de parafina dos tumores para análise imuno-histoquímica das expressões de E-caderina e vimentina..... 10

Figura 2 Corte microscópico representativo da expressão imuno-histoquímica da E-caderina preservada no epitélio tumoral (CEP), em que aproximadamente 100% das células são fortemente positivas para este marcador..... 17

Figura 3 Corte de microscopia óptica em aumento de 10 vezes de neoplasia de pênis em que a E-caderina mostrou-se com uma perda leve da expressão imuno-histoquímica 18

Figura 4 Imagem microscópica mostrando perda acentuada da expressão imuno-histoquímica da E-caderina no CEP em aumento de 10 vezes 18

Figura 5 Tumor de pênis com ausência de expressão imuno-histoquímica de vimentina (microscopia óptica - aumento de 10 vezes) 19

Figura 6 Imagem de neoplasia de pênis com expressão imuno-histoquímica positiva de vimentina (microscopia óptica - aumento de 10 vezes). 19

Figura 7 Curva de sobrevida global em 176 meses de seguimento médio para os pacientes estudados 26

Figura 8 Curva de sobrevida global para os pacientes estudados estratificados de acordo com a realização ou não de linfadenectomia regional, e extensão do esvaziamento, quando realizado (log rank p= 0,001)..... 27

Figura 9 Curva de sobrevida global para os pacientes estudados estratificados pelo estádio patológico T (log rank p= 0,046)..... 27

Figura 10 Curva de sobrevida livre de doença em 176 meses de seguimento médio para a amostra estudada 30

Figura 11 Curva de sobrevida livre de doença no seguimento médio de 176 meses (IC 95%: 144,6 - 207,5 meses) para a amostra estudada estratificada de acordo com a expressão imuno-histoquímica da E-caderina (log rank p=0,012)..... 31

Figura 12 Curva de sobrevida livre de doença no seguimento analisado para a amostra estudada estratificada de acordo com a presença de invasão perineural (log rank p=0,018) 31

Figura 13 Curva de sobrevida câncer específica em 176 meses de seguimento médio para a amostra estudada 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição da amostra estudada de acordo com a realização de linfadenectomia 15

Tabela 2 Distribuição da amostra estudada de acordo com as variáveis epidemiológicas e clínicas 16

Tabela 3 Distribuição quanto às variáveis clinicopatológicas dos 81 pacientes portadores de CEP estudados 20

Tabela 4 Distribuição da amostra estudada de acordo com a análise da expressão imuno-histoquímica de E-caderina e vimentina agrupada (fronte de invasão e centro tumoral) 22

Tabela 5 Associações entre as diferentes variáveis relacionadas ao tumor primário e a expressão imuno-histoquímica da vimentina e da E-caderina na fronte de invasão tumoral. 23

Tabela 6 Associações entre as diferentes variáveis relacionadas ao tumor primário e a expressão imuno-histoquímica da vimentina e da E-caderina no centro tumoral 24

Tabela 7 Associação entre as diferentes variáveis relacionadas ao tumor primário e a expressão imuno-histoquímica da vimentina e da E-caderina no centro tumoral e fronte de invasão analisadas de forma agrupada 25

Tabela 8 Probabilidade acumulada de SG no seguimento analisado de acordo com as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas 28

Tabela 9 Risco de óbito em pacientes submetidos ou não à linfadenectomia no modelo de regressão de Cox 29

Tabela 10 Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença no seguimento médio de 176 meses (IC 95%: 144,6 - 207,5 meses) de acordo com as variáveis clinicopatológicas de interesse descritas 32

Tabela 11 Risco relativo de recidiva tumoral no grupo estudado de acordo com a variável invasão perineural 33

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC *American Joint Committee on Cancer*

CEP carcinoma escamoso do pênis

EAU *European Association of Urology*

IC intervalo de confiança

IPN invasão perineural

IVM invasão vascular microscópica

HPV papiloma vírus humano (do inglês, Human Papiloma Virus)

HR risco relativo da ocorrência do evento em função do tempo (do inglês, hazard ratio)

LNFD linfonodos

LI linfadenectomia inguinal

NCCN *National Comprehensive Cancer Network*

OR Razão de chances (do inglês, odds ratio)

TEM transição epitélio-mesenquimal

TMA *tissue microarray*

TME transição mesênquima-epitélio

SCE sobrevida câncer específica

SG sobrevida global

SLD sobrevida livre de doença

UICC *Union for International Cancer Control*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 8

3 METODOLOGIA 9

3.1 Critérios de Inclusão 13

3.2 Critérios de Exclusão 13

3.3 Estatística 13

3.4 Considerações Éticas e Consentimento Pós-Informado 14

4 RESULTADOS 15

5 DISCUSSÃO 34

5.1 Aspectos gerais 34

5.2 Invasão Perineural 35

5.3 Transição epitélio-mesenquimal 37

5.4 Linfadenectomia inguinal 39

5.5 Estádio patológico T 39

5.6 Limitações e impacto na prática clínica 41

6 CONCLUSÕES 44

7 REFERÊNCIAS 45

ANEXOS

Anexo 1 Documento de acordo interinstitucional A.C.Camargo Cancer Center- Lee Moffitt Cancer Center

Anexo 2 Carta convite e certificado do *Academic Visitor and Scholar Program*

Anexo 3 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma escamoso do pênis (CEP) é uma neoplasia rara, mas recentemente a literatura tem demonstrado um aumento na sua incidência e mortalidade específica (Adashek et al. 2019). A incidência do CEP é heterogênea, sendo maior na América do Sul, Ásia e África. Na Índia, a doença é responsável por até 11,6% dos cânceres masculinos (Takiar e Kumar 2014). No Brasil, o CEP é responsável por 2,1% das neoplasias em homens (Favorito et al. 2008). No estado brasileiro do Maranhão, mostrou-se uma incidência de 6,1 casos para grupo de 100.000 habitantes do sexo masculino, uma das maiores taxas globais de CEP (Coelho et al. 2018; Vieira et al. 2020).

A doença atinge mais comumente homens na 6ª década de vida, porém homens mais jovens também são acometidos e podem estar sob maior risco de abrigarem tumores com comportamento mais agressivo (Paiva et al. 2015).

Mais de 95% dos tumores de pênis compreendem o carcinoma de células escamosas. A maioria dos casos de CEP surge como uma lesão indolor nodular ou ulcerada na glande, sulco coronal ou no prepúcio. Ao menos 25% dos pacientes com CEP manifestam história de uma condição patológica pré-existente na pele que recobre o pênis, como balanite xerótica obliterante, fimose, inflamação crônica, doença de Bowen, verrugas, Eritroplasia de Queyrat, lesões ceratóticas ou displasia (Stecca et al. 2021).

O envolvimento linfonodal pode estar presente no momento do diagnóstico e, por vezes, é clinicamente evidente no exame físico. Os linfonodos (LNFD) inguinais são palpáveis em 28-64% dos pacientes no momento de apresentação da doença, entretanto a doença será metastática em cerca de 47–85% destes (Heyns et al. 2010).

Os fatores de risco mais relevantes para o aparecimento do CEP incluem a infecção por HPV, a presença de fimose, a ausência de circuncisão, a má higiene genital, a presença de líquen escleroso, o tabagismo, um baixo *status* socioeconômico e a zoofilia (Douglawi e Masterson 2017; Thomas et al. 2020; Zequi et al. 2012).

Os modelos mais recentes de classificação histopatológica separam os subtipos de CEP em HPV e não-HPV relacionados, uma vez que entre estes dois grupos existem diferenças morfológicas e prognósticas (Sanchez et al. 2015). Para o CEP são descritas 21 variantes

morfológicas, das quais 12 são não relacionadas ao HPV e outras nove, relacionadas ao HPV (Canete-Portillo et al. 2019).

Uma revisão sistemática da literatura mostrou que a presença do HPV pode ser detectada em 48% dos casos de CEP (Backes et al. 2009). Outro estudo também confirmou esses achados, identificando HPV em 46,9% dos tumores de pênis (Miralles-Guri et al. 2009). O HPV 16 e o 18 representam os tipos mais comumente associados ao CEP, seguidos pelos sorotipos 31 e 33 (Hakenberg et al. 2018). A diferenciação entre o CEP associados e os não relacionados ao HPV pode ser feita por meio de reação em cadeia da polimerase ou a partir da detecção imuno-histoquímica da proteína p16 no tumor peniano (Hakenberg et al. 2018).

O tratamento atual do CEP é quase exclusivamente baseado em resultados de estudos desenvolvidos em séries retrospectivas. Para todos os estágios do tratamento do CEP faltam evidências de alta qualidade científica. Este fato acrescido da raridade da doença resulta em uma condução clínica subótima do CEP.

Os objetivos do tratamento do tumor primário são a remoção completa do tumor com a maior preservação possível do órgão, sem comprometer o controle oncológico. Não há ensaios clínicos randomizados ou estudos comparativos observacionais que tenham avaliado as opções de tratamento para CEP localizado. A preservação peniana é superior em resultados funcionais e estéticos comparada à penectomia parcial ou total. As modalidades de tratamento local para o CEP localizado incluem cirurgia excisional, radioterapia externa, braquiterapia e ablação com laser (Hakenberg et al. 2015).

A recorrência local, definida como a presença de tumor após o tratamento primário, ocorre em até 30% dos pacientes com CEP e aumenta a possibilidade de metástases linfonodais inguinais e pélvicas e de morte pela doença (Chaux et al. 2009a; Alkatout et al. 2011).

O CEP é considerado uma doença locorregional com um padrão presumível de disseminação que ocorre essencialmente por via linfática, atingindo sequencialmente os LNFD inguinais superficiais e profundos e em seguida os LNFD pélvicos. A presença e a extensão de metástases linfonodais é determinante para a evolução e sobrevida dos pacientes, sobrepondo-se a qualquer critério clínico ou patológico do tumor primário (Chahoud et al. 2021).

Numa coorte retrospectiva de 1000 pacientes com CEP tratados ao longo de 56 anos a SCE foi respectivamente de 96% para os pacientes pN0, 80% para pN1, 66% para pN2 e 37%

para os pacientes pN3 (Djajadiningrat et al. 2014). Entretanto, a inexistência de metástase linfonodal não garante, de forma absoluta, a cura da doença. Fatores anatomopatológicos relacionados ao tumor primário podem determinar evoluções distintas neste grupo de pacientes (Aita 2014).

O tratamento dos LNFD regionais depende do estádio clínico dos LNFD inguinais. Se não há LNFD inguinais palpáveis (cN0) ou identificáveis por método de imagem (ultrassonografia inguinal, tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética), o estadiamento linfonodal cirúrgico deve ser realizado de acordo com os fatores anatomopatológicos do tumor primário. Os pacientes com LNFD clinicamente negativos (cN0) têm aproximadamente 25% de chance de abrigarem metástases inguinais ocultas (Hu et al. 2019).

Quando há LNFD aumentados, uni ou bilateralmente (estádios cN1 ou cN2), a LI radical está indicada, tendo em vista que o comprometimento linfonodal tumoral é altamente provável nestes casos. Na presença de LNFD inguinais fixos e aumentados (estádio cN3), indica-se o tratamento multimodal com quimioterapia neoadjuvante e cirurgia subsequente. A detecção de extensão extranodal em metástases linfonodais está associada a um alto risco de progressão da doença e é classificada como pN3, que também requer tratamento multimodal (Hakenberg et al. 2015).

Por outro lado, a cura do CEP pode ser alcançada mesmo quando há LNFD comprometidos por tumor, e é inversamente proporcional ao número e extensão das metástases linfonodais (Djajadiningrat et al. 2014). Portanto, a detecção precoce e o tratamento das metástases linfonodais no CEP são de extrema importância.

O estadiamento cirúrgico dos LNFD inguinais está associado a uma morbidade significativa, com índices de complicação como hematoma, linfocele, necrose de pele, infecção de ferida operatória, linfedema escrotal e de membros inferiores envolvendo até 80% dos pacientes operados, mesmo nas séries mais recentes de centros de referência (Sharma et al. 2016). Este fato contribui para sua subutilização entre os urologistas, impactando diretamente na mortalidade da doença (Albersen e Spiess 2019; Li et al. 2021). Dois estudos americanos mostraram que mesmo no CEP de alto grau ou invasivo, somente 19 a 37% dos pacientes é submetida a LI conforme recomendação do NCCN (Campbell et al. 2017; Chipollini et al. 2017).

Mesmo com o tratamento adequado, a sobrevida em cinco anos no CEP é de cerca de 50%, e menor ainda, atingindo 27% nos pacientes com doença linfonodal (Barski et al. 2014).

O tratamento multidisciplinar, preferencialmente em centros especializados com alto volume é imperativo para o adequado manejo da doença, além de ser importante para o recrutamento e o desenvolvimento de ensaios clínicos (Tang et al. 2014; Stecca et al. 2021).

De forma intrigante, dados estatísticos provenientes dos EUA, França e Noruega revelam que as taxas de sobrevida dos pacientes com CEP permaneceram inalteradas durante os respectivos períodos de 10, 20 e 60 anos, apesar de todos os esforços na melhoria dos métodos diagnósticos e terapêuticos Daubisse-Marliac et al. 2017; Pham et al. 2017; Hansen et al. 2018). É importante ressaltar que a maioria dos agentes citotóxicos atualmente usados para tratamento do CEP foram introduzidos há pouco mais de 10 anos.

Atualmente, a forma de tratar e seguir os pacientes com CEP que têm LNFD inguinais clinicamente negativos ainda não é axiomática. A inexistência de LNFD comprometidos por neoplasia infere uma evolução favorável em confronto aos pacientes com LNFD positivos. Contudo, a ausência de metástase em LNFD não é prerrogativa de cura do CEP. Uma fração destes pacientes poderá manifestar recidiva locorregional, progressão tumoral ou mesmo óbito pela doença.

O estudo dos fatores prognósticos em pacientes com CEP e LNFD negativos para acometimento linfonodal foi tema de dissertação de mestrado (Aita 2014). Na amostra estudada, que incluiu 261 pacientes tratados no A.C.Camargo Cancer Center no período de 1953 a 2012, concluímos que o alto grau de diferenciação histológica e o padrão da fronte tumoral infiltrativo*,* quando presentes no tumor peniano primário estavam associados a um pior prognóstico para a sobrevida global e câncer específica em análises multivariadas (Aita et al. 2015, 2016).

A fronte de invasão tumoral expressa a relação entre o tumor e o tecido hospedeiro. Ela pode ser classificada como infiltrativa, quando há invasão em blocos de pequenas ilhas tumorais infiltradas no estroma, ou expansiva, quando as células tumorais formam conglomerados onde é possível definir de forma mais clara a interface tumor-hospedeiro (Bryne et al. 1998). Outros estudos anteriormente publicados já confirmavam o papel da fronte de invasão como importante fator prognóstico na evolução dos pacientes com CEP (Guimarães et al. 2006; Alkatout et al. 2011). Entretanto, faltam marcadores biomoleculares determinantes de desfechos clínicos nestes pacientes, tema pesquisado nesta tese.

A classificação molecular e o conhecimento de biomarcadores de vários tipos de tumores resultaram em aplicações clínicas relevantes como a terapia-alvo, dando início ao que se convencionou designar medicina de precisão (Thomas et al. 2021). Há uma compreensão bastante limitada dos mecanismos biológicos, do microambiente tumoral e dos biomarcadores no câncer de pênis (Stecca et al. 2021).

A origem das metástases é um encadeamento complexo de algumas etapas essenciais. Incluem-se neste processo a invasão local, o acesso de células tumorais à circulação, denominado intravasamento, a migração para sítios à distância (extravasamento) e a adaptação e sobrevivência no sítio distante (Micalizzi et al. 2017). Cada uma destas etapas requer modificações genéticas e epigenéticas para que a progressão tumoral evolua.

A partir de populações celulares heterogêneas do tumor primário advêm as células metastáticas, as quais serão selecionadas e adaptadas de forma a sobreviverem ao processo de metastatização (Arvelo et al. 2016). Os agentes mais importantes neste curso são as células tumorais circulantes que, ao se desprenderem da massa tumoral original, adquirem características específicas e necessárias para sobreviver na corrente sanguínea e dar origem à metástase. Alguns estudos têm demonstrado que a propriedade mais relevante e necessária para a propagação e sobrevivência de células tumorais circulantes é representada pelo processo de desdiferenciação celular. A plasticidade da célula tumoral durante todas as etapas descritas anteriormente é suportada por dois mecanismos principais: a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e sua contraparte reversa - transição mesênquima-epitélio (TME) (Fouad e Aanei 2017; Pradella et al. 2017; Paolillo e Schinelli 2019).

Fica claro, então, que o processo de formação das metástases pressupõe que células neoplásicas abandonem o tumor primário através da supressão da adesão celular e aquisição de características migratórias. Isto é viabilizado por alterações na expressão gênica, que determinam uma mudança fenotípica celular, fenômeno descrito como TEM (Fouad e Aanei 2017).

A TEM é um processo biológico complexo em que as células epiteliais privam-se da adesão intercelular e da polaridade apical-basal, modulam o seu citoesqueleto, adquirindo resistência à apoptose e maior capacidade de invasão e migração, e por fim, desenvolvem um fenótipo mesenquimal (Yang et al. 2020).

Em vários tumores sólidos a TEM está associada a um comportamento agressivo, com maior capacidade de invasão, maior incidência de metástases e pior evolução clínica (Luo et

al. 2018). Além de ser determinante na invasão e disseminação de células tumorais, a TEM também pode estar ligada à aquisição de características celulares que conferem maior resistência ao tratamento oncológico sistêmico (Jolly et al. 2015; Pradella et al. 2017).

As alterações descritas no fenômeno TEM englobam a subtração da expressão de marcadores epiteliais, como os filamentos de citoqueratina, diminuição expressiva nas moléculas promotoras da adesividade intercelular, como a E-caderina, ocludinas, claudinas, desmoplaquinas, cateninas, entre outras, e, a maior imunoexpressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina, N-caderina e a fibronectina-1 (Kang et al. 2014; Pradella et al. 2017).

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio localizada no tecido epitelial. É uma importante molécula de adesão celular e um fator de transdução de sinal que direciona a formação de complexos proteicos ligados ao citoesqueleto de actina em combinação com a formação de beta-catenina (Zhou et al. 2015). A supressão da expressão da E-caderina está associada a um maior potencial metastático e prognóstico adverso em pacientes com CEP (Campos et al. 2006; Zhu et al. 2007).

A vimentina é um proteína do citoesqueleto não expressa em células epiteliais, mas amplamente distribuída em fibroblastos, células endoteliais e linfócitos. Vários estudos evidenciam que a expressão anormal de vimentina é observada em uma variedade de neoplasias epiteliais, mostrando estreita relação com a grau de diferenciação celular, capacidade de invasão e metastatização da célula cancerosa (Zhou et al. 2015; Jain et al. 2019).

A TEM é descrita também na embriogênese e durante a cicatrização tecidual. Este processo é regulado por vários fatores de transcrição, os quais são considerados marcadores da TEM. São eles: proteínas SNAI1 e SNAI2, E-box-binding, homeobox 1 (ZEB1, ZEB2), TWIST, forkhead box protein 1 (FOXC1), FOXC2, homeobox protein, goosecoid (GSC), N-caderina, vimentina e fibronectina-1 (Pradella et al. 2017). No entanto, os processos de TEM e TME, embora amplamente estudados, ainda estão longe de serem completamente compreendidos.

Admite-se que a TEM atue nos primeiros passos para preparar as células circulantes tumorais que, ao sobreviverem na circulação, atingem o local ou órgão apropriado, passam por TEM e ganham as características adequadas e necessárias para moldar o sítio como um nicho pré-metastático e assim promover a progressão do tumor (Jolly et al. 2017).

Alguns estudos têm mostrado que o padrão heterogêneo de diferenciação celular no CEP pode ser evidente mesmo no tumor individual. Essa heterogeneidade dentro do mesmo

tumor é representada por subpopulações celulares com diferentes fenótipos e com capacidades distintas de invasão e migração (Arvelo et al. 2016; Basu et al. 2010).

A TEM não pode ser avaliada de forma completa com base em apenas um ou um pequeno número de marcadores moleculares. A complexa série de alterações celulares que ocorrem durante a TEM requer idealmente a avaliação de mais de um fator molecular. Estes fatores podem ser divididos em três grupos: sinais indutores da TEM, fatores de transcrição da TEM, como Snai2, E47, Twist1, Zeb1 e Zeb2, e os marcadores moleculares da TEM, como a vimentina e a E-caderina (Yang et al. 2020). As principais classes de marcadores epiteliais ou mesenquimais que têm sido usados para determinar a presença de TEM são as proteínas de superfície (E-caderina) e os marcadores do citoesqueleto (vimentina e β-catenina).

Considerando-se a heterogeneidade do CEP, especialmente quando há invasão de prepúcio, lâmina própria, corpo cavernoso ou esponjoso (Jayaratna et al. 2014; Rieken et al. 2014), a identificação e a validação de novos fatores prognósticos moleculares pode auxiliar nas decisões terapêuticas, indicando quais pacientes poderão ser poupados das dissecções linfonodais regionais, evitando assim a morbidade associada a este procedimento. Além disso, tal achado poderá ajudar a selecionar os pacientes com CEP que poderão ser beneficiados por alguma espécie de tratamento adjuvante.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina e vimentina nos pacientes submetidos a LI ou linfadenectomia inguino-ilíaca e com LNFD histologicamente negativos (pN0) e nos pacientes com LNFD clinicamente negativos (cN0);
- Cotejar os achados descritos acima com os dados epidemiológicos e clinicopatológicos;
- Avaliar o impacto da expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina e vimentina como fatores prognósticos nas taxas de SG, SCE e SLD.

3 METODOLOGIA

O estudo endereçou os pacientes com diagnóstico de CEP que atendiam aos critérios de inclusão descritos abaixo e que foram tratados no Departamento de Cirurgia Pélvica e no Núcleo de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center (São Paulo-SP) entre janeiro de 1953 e dezembro de 2017.

Idealizamos um estudo colaborativo internacional, adicionando os casos de CEP que atendiam aos critérios de inclusão mencionados abaixo e disponíveis no banco de dados do Lee Moffitt Cancer Center, Flórida, EUA. Para tanto, protagonizamos um acordo interinstitucional com o objetivo específico de cooperação nesta pesquisa e envio de material biológico para o Lee Moffitt Cancer Center (Anexo 1). Sequencialmente eu, Giuliano, estive no referido centro em Tampa, Flórida no período de 01/07/2019 a 12/07/2019 (Anexo 2) como visitante (Academic Visitor and Scholar Program) para acompanhar a coloração imuno-histoquímica das lâminas previamente preparadas no A.C.Camargo Cancer Center. No Lee Moffitt Cancer Center identificamos pouco mais de 20 casos de CEP que atendiam aos critérios de inclusão da pesquisa. Entretanto, os dados clínicos e patológicos dos mesmos eram insuficientes para a sua inclusão no nosso banco de dados.

Após a coloração imuno-histoquímica, deparamo-nos com um grande obstáculo, a deficiência de médicos patologistas nos EUA, o que inviabilizou a leitura das lâminas no centro americano. A partir disto, decidimos retornar com o material para o Brasil para a conclusão do estudo.

No período analisado, aplicando-se os critérios de inclusão e de exclusão da pesquisa, foram elegidos 116 pacientes com diagnóstico CEP tratados no Departamento de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center. A **Figura 1** retrata o fluxo de seleção dos casos de CEP incorporados nesta análise. Foi possível a recuperação dos blocos de parafina da peça cirúrgica do tumor primário de 103 pacientes. Destes, 22 blocos de parafina já haviam se esgotado como fonte de estudo, devido às diversas secções para pesquisas realizadas na instituição. Assim, 81 possuíam material anatomopatológico em condições adequadas para análise e coloração imuno-histoquímica. Este material foi revisado por uma médica patologista especializada (S.B.), integrante da instituição, e posterior avaliação imuno-histoquímica.

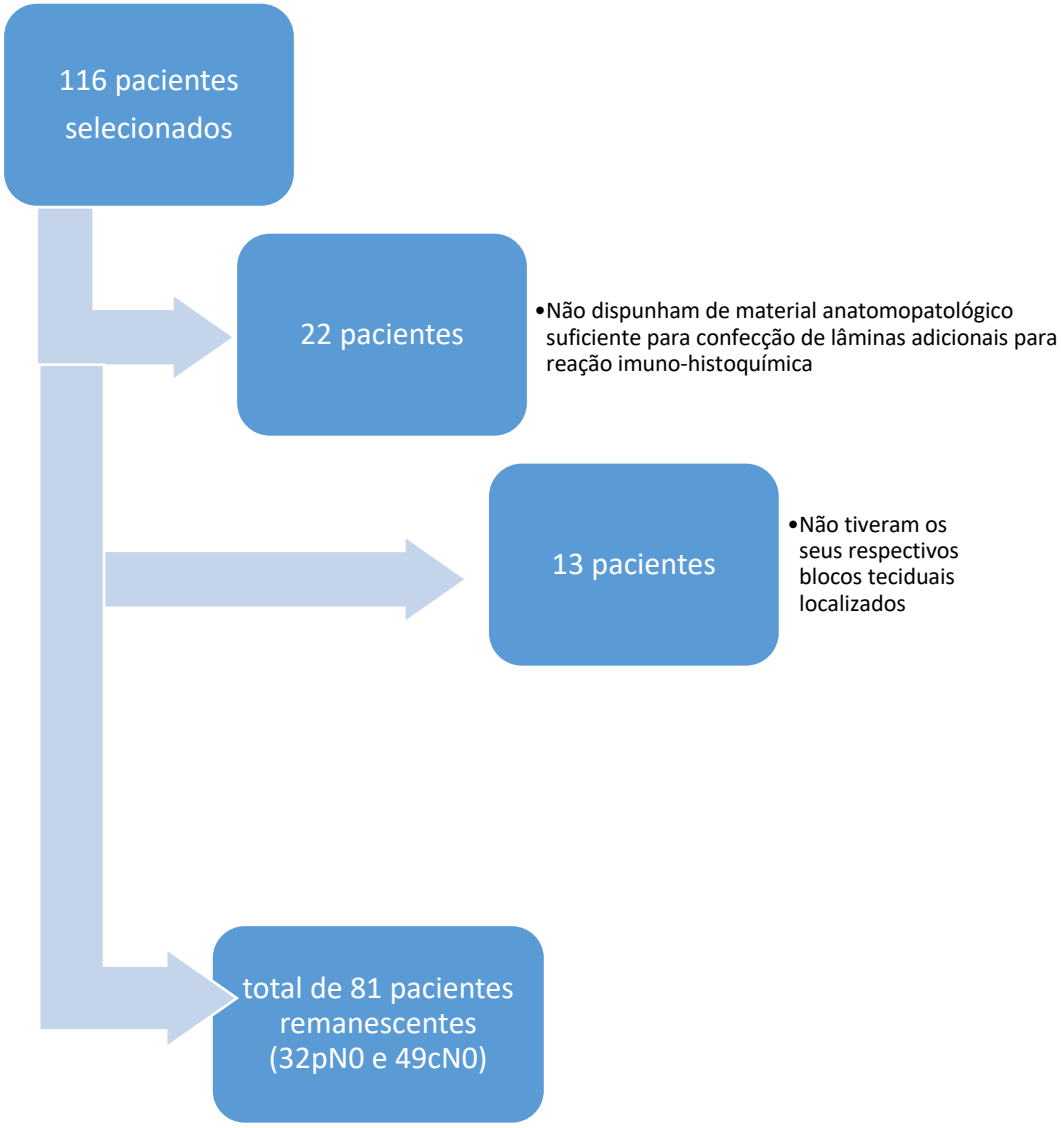

Figura 1 - Seleção da população de estudo e disponibilidade de blocos de parafina dos tumores para análise imuno-histoquímica das expressões de E-caderina e vimentina.

Para a classificação histológica consideramos os seguintes subtipos: carcinoma epidermóide usual, carcinoma basalóide, carcinoma verrucoso, warty, carcinoma papilar, sarcomatóide, carcinomas mistos, adenoescamoso, pseudohiperplásico, carcinoma cunilatum, pseudoglandular, warty-basalóide, giant condiloma e anaplásico (Chaux et al. 2012; Epstein et al. 2011; Sanchez et al. 2015).

Classificamos os tumores quanto ao grau de diferenciação nas seguintes categorias: baixo grau, grau intermediário e alto grau, seguindo os critérios definidos por Velazquez et al. (2008).

As variáveis clinicopatológicas e epidemiológicas apreciadas foram: idade, orientação sexual; raça; postectomia prévia, antecedentes venéreos; tempo de evolução da doença; doença prévia relacionada ao CEP; estadiamento pelo TNM AJCC 7ª ed. (Edge et al. 2009); subtipo histológico; grau de diferenciação histológico; presença ou ausência de invasão vascular microscópica (IVM) e de invasão perineural (IPN), padrão de bordas tumorais (ou fronte de invasão) – expansivo ou infiltrativo descrito por Bryne et al. (1998) e a expressão imuno-histoquímica da vimentina e E-caderina no centro e na fronte de invasão tumoral.

Os pacientes não submetidos a linfadenectomia inguinal ou inguino-ilíaca que não apresentaram metástases linfonodais num seguimento maior ou igual a três anos, ou seja, pertencentes ao estádio clínico N0, foram designados cN0, após esta longa observação sem metástases em LNFD, tendo em vista que a ocorrência de metástases linfonodais é extremamente rara após este período (Pizzocaro et al. 2010).

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal “anti-human E-cadherin mouse” (Dako, Carpinteria, CA). Os cortes foram desparafinados, reidratados e pré-tratados para recuperação antigênica pelo calor. Os procedimentos de histologia e imuno-histoquímica foram realizados no *Core Facility* de Histologia-IHQ-TMA do A.C.Camargo Cancer Center.

Os blocos tumorais foram seccionados em micrótomo (Leica, RM2255) numa espessura de 4 µm. As imunorreações foram processadas no sistema Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems). A imunomarcação foi efetivada com o conjunto de detecção Ultraview (cat. 760-500, Ventana Medical Systems). A retirada de parafina das lâminas foi executada com a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). Posteriormente, empreendemos a recuperação antigênica dos cortes por 30 minutos com o reagente *cell conditioning* 1 (cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C. Na sequência, as lâminas foram encaminhadas para incubação por 30 minutos com anti-E-caderina (Ventana, 36) e anti-Vimentina (Ventana, V9).

Após as reações imuno-histoquímicas, procedemos a montagem das lâminas com auxílio do Entellan (cat. 107961, Merck) para o posterior encaminhamento para avaliação histopatológica. Como controle positivo da expressão imuno-histoquímica da E-caderina

utilizou-se o epitélio normal peniano. O controle positivo da expressão de vimentina teve como referência as células estromais, fibroblastos e as células endolteliais.

Os resultados de imunorreatividade foram averiguados da seguinte forma: a expressão de E-caderina foi analisada na membrana das células neoplásicas, e classificada como **positiva** (ou preservada, retratando o padrão normal) ou **negativa** (perda leve ou perda acentuada de expressão). Este marcador foi considerado **positivo** (expressão imuno-histoquímica preservada) quando mais de 60% das células neoplásicas exibiam uma expressão moderada a forte (2/3+), e menos de 1% das células eram negativas para este anticorpo**.** A **perda leve** foi definida quando havia entre 1 e 10% de células negativas para o anticorpo e a **perda acentuada** de expressão quando mais de 10% das células neoplásicas apresentavam negatividade para este anticorpo. O controle positivo da expressão imuno-histoquímica de vimentina teve como referência o padrão encontrado nos fibroblastos, nas células endoteliais e estromais. Para analisar a expressão da vimentina, consideramos o padrão citoplasmático nas células tumorais, e, dessa forma, a expressão foi classificada como **positiva** ou **negativa**. Quando 10% ou mais células expressaram vimentina, consideramos o teste como **positivo**. Do contrário, o teste foi classificado como **negativo**.

A escolha destes valores como pontos de corte foi baseada no estudo prévio do nosso grupo no qual se comprovou que o epitélio normal peniano analisado em peças cirúrgicas de postectomia apresenta uma forte expressão imuno-histoquímica da E-caderina em cerca de 60,2 a 86% das células (da Cunha et al. 2016).

As amostras tumorais de ambos os anticorpos foram analisadas em duas áreas: no centro tumoral e na extremidade mais profunda e infiltrativa do tumor (fronte de invasão). A expressão imuno-histoquímica da e-caderina na fronte de invasão foi considerada como positiva ou negativa, independentemente de, em caso de perda de expressão, ter sido leve ou acentuada. Os cortes histológicos foram avaliados em lâmina total, utilizando-se uma lâmina para cada marcador (E-caderina e vimentina), a fim de obter-se uma amostra mais representativa do tumor.

A sobrevida global (SG) foi determinada como o intervalo de tempo em meses entre a data da cirurgia do tumor primário e o momento do óbito por qualquer causa, ou a última informação clínica acessível. A sobrevida câncer específica (SCE) foi conceituada como o intervalo (em meses) entre a data da cirurgia do tumor primário e a morte relacionada ao câncer ou a última data de acompanhamento para pacientes censurados. Por sobrevida livre

de doença (SLD) definiu-se o intervalo, também em meses, entre a data da cirurgia do tumor primário e a data da recidiva tumoral ou a última data de seguimento clínico. O não comparecimento do paciente em duas visitas clínicas sequenciais e/ou inexistência de informações além desta data foi entendida como perda de seguimento. Qualquer evidência de retorno da doença primária, seja por método de imagem (ultrassonografia inguinal, tomografia computadorizada ou ressonância magnética com contraste intravenoso) e/ou biópsia confirmatória após o tratamento cirúrgico com finalidade curativa foi compreendida como recidiva tumoral.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com CEP submetidos a LI ou linfadenectomia inguino-ilíaca e com LNFD histologicamente negativos tratados entre janeiro de 1953 a dezembro de 2017 no A.C.Camargo Cancer Center;
- Pacientes com CEP e estádio clínico cN0 seguidos por período igual ou superior a 3 anos na instituição no intervalo de tempo descrito acima;

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes cujos dados clínicos e/ou patológicos foram não suficientes para avaliação comparativa descrita no estudo;
- Pacientes com material arquivado em parafina em não adequado para análise anatomopatológica e/ou imuno-histoquímica;
- Pacientes que fizeram neoadjuvância (quimioterapia ou radioterapia);
- Pacientes com tumores não epiteliais do pênis;

3.3 ESTATÍSTICA

Os dados colhidos dos prontuários foram reunidos em um banco de dados utilizando-se o programa *Excel 14.3.4 for Mac 2011*. A análise estatística foi feita com o software *IBM Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 21.

As comparações entre os grupos foram realizadas com o teste qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher.

A SG, SCE e a SLD foram analisadas usando o estimador produto-limite de Kaplan e Meier. O teste log-rank foi utilizado a fim de comparar as curvas estimadas para cada categoria dentro de uma variável estabelecida. Aplicamos um nível de significância de 5% para todos os testes. Valores de HR crus e ajustados foram mencionados seguidos dos respectivos IC 95%. O modelo de risco proporcional de Cox foi usado com o propósito de determinar quais variáveis influenciaram SG, SCE ou SLD. As suposições de risco proporcional foram verificadas usando os resíduos de Schoenfeld.

3.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Nosso atual estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP da Fundação Antônio Prudente, mantenedora do A.C.Camargo Cancer Center em 11/10/2018 sob o registro 2.958.839 (Anexo 3) com dispensa do consentimento pós-informado pelo seu caráter retrospectivo (CAAE: 72112517.0.0000.5432).

4 RESULTADOS

No período pesquisado, 116 pacientes diagnosticados com CEP e LNFD negativos (cN0 e pN0) foram tratados no Departamento de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center. Deste total, 81 (69,82%) estavam em condições que permitiram a confecção de lâminas e imunorreação para análise imuno-histoquímica, conforme ilustrado na **Figura 1**. O tempo de seguimento médio foi de 176 meses (IC 95%: 144,6 - 207,5 meses). Da amostra de 81 pacientes, 32 (39,5%) eram pN0 e os demais 49 (60,5%) eram cN0. Dentre os 32 pN0, 18 (56,25%) foram submetidos a LI e 14 (43,75%) a linfadenectomia inguino-ilíaca. Estes dados são apresentados na **Tabela 1.** A média do número de LNFD ressecados foi de 24 por paciente.

Tabela 1 – Distribuição da amostra estudada de acordo com a realização de linfadenectomia. A.C.Camargo Cancer Center.

Grupo	pN0		cN0		
Variável	n	%	n	%	
Linfadenectomia inguinal	18	56,25	Não se aplica		
Linfadenectomia inguino-ilíaca	14	43,75	Não se aplica		
Total	32	39,5	49	60,5	81

A **Tabela 2** mostra a distribuição quanto aos critérios clínicos e epidemiológicos analisados. A média de idade dos pacientes foi de 53 anos, com uma mediana de 54 anos, variando de 27 a 87 anos. O tempo de evolução mediano da doença foi de 12 meses. Quanto à orientação sexual, 60 pacientes (74,1%) declararam-se heterossexuais e em 21 pacientes (25,9%) essa informação foi ausente. Na distribuição por cor, 54 pacientes (66,7%) foram considerados brancos; dois pacientes (2,5%) amarelos e 8 (9,9%) foram classificados como negros. Vinte e seis pacientes (32,1%) relataram passado de infecções sexualmente transmissíveis. Quando se analisou a frequência de postectomia prévia ao diagnóstico de CEP, 55 (67,9%) pacientes eram não circuncidados.

A ocorrência de doenças ou condições clínicas prévias relacionadas ao diagnóstico de neoplasia de pênis, tais como fimose, doença de Bowen, líquen escleroso ou balanite xerótica

obliterante foi observada em 36 (48%) dos pacientes. Os estádios clínicos T2 e T3 do TNM 7ª ed. (UICC AJCC) foram os que obtiveram maior representatividade na amostra estudada. Assim, vinte e nove (46%) pacientes e 23 (36,5%) pacientes foram classificados como cT2 e cT3, respectivamente (Edge et al. 2009). A distribuição por estádios clínicos N0, N1, N2 foi 34 (54,8%), 5 (8,0%) e 23 (37,1%) pacientes, respectivamente (embora todos tivessem linfonodos negativos após seguimento clínico mínimo de 3 anos ou patologicamente negativos nesta população). O estadiamento agrupado TNM mais prevalente foi o II, observado em 30 (47,6%) dos pacientes.

Tabela 2 – Distribuição da amostra estudada de acordo com as variáveis epidemiológicas e clínicas. A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	N	Frequência (%)
Orientação sexual		
Heterossexual	60	74,1
Ignorado/não avaliável	21	25,9
Cor		
branca	54	69,2
amarela	02	2,6
negra	08	10,3
parda	14	17,9
Ignorado/não avaliável	03	
Antecedentes venéreos		
não	42	61,8
sim	26	38,2
Ignorado/não avaliável	13	
Postectomia prévia ao CEP		
Não realizada	55	72,4
Não relacionada	07	9,2
Relacionada	14	18,4
Ignorado/não avaliável	05	
Doenças prévias relacionadas		
Não	39	52
Líquen escleroso	01	1,3
Doença de Bowen	01	1,3
Condiloma	05	6,7
fimose	28	37,3
Balanite xerótica obliterante	01	1,3
Ignorado/não avaliável	06	

A **Tabela 3** ilustra a incidência relativa dos subtipos histológicos analisados, bem como outras variáveis anatomopatológicas, a saber: presença de invasão vascular microscópica (IVM), invasão perineural (IPN), invasão uretral ou de corpo esponjoso e invasão de corpo cavernoso, a fronte de invasão tumoral (padrão expansivo ou infiltrativo), a expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina e vimentina no centro tumoral e na extremidade mais

profunda e infiltrante do tumor (fronte de invasão) e a quanto à realização ou não de esvaziamento linfonodal, bem como quanto ao tipo de dissecção realizada.

A **Figura 2** mostra uma microfotografia representativa da expressão imuno-histoquímica da E-caderina preservada no epitélio tumoral, em que a quase totalidade das células são fortemente positivas para este marcador. A **Figura 3** ilustra uma perda leve da expressão imuno-histoquímica E-caderina no CEP. Na **Figura 4** apresenta-se a imagem microscópica da perda acentuada da expressão imuno-histoquímica da E-caderina no CEP em aumento de 10 vezes. A **Figura 5** ilustra tecido tumoral com ausência da expressão imuno-histoquímica da vimentina (aumento de 10 vezes). Na **Figura 6** está apresentada imagem de neoplasia de pênis com expressão imuno-histoquímica positiva da vimentina (microscopia óptica – aumento de 10 vezes).

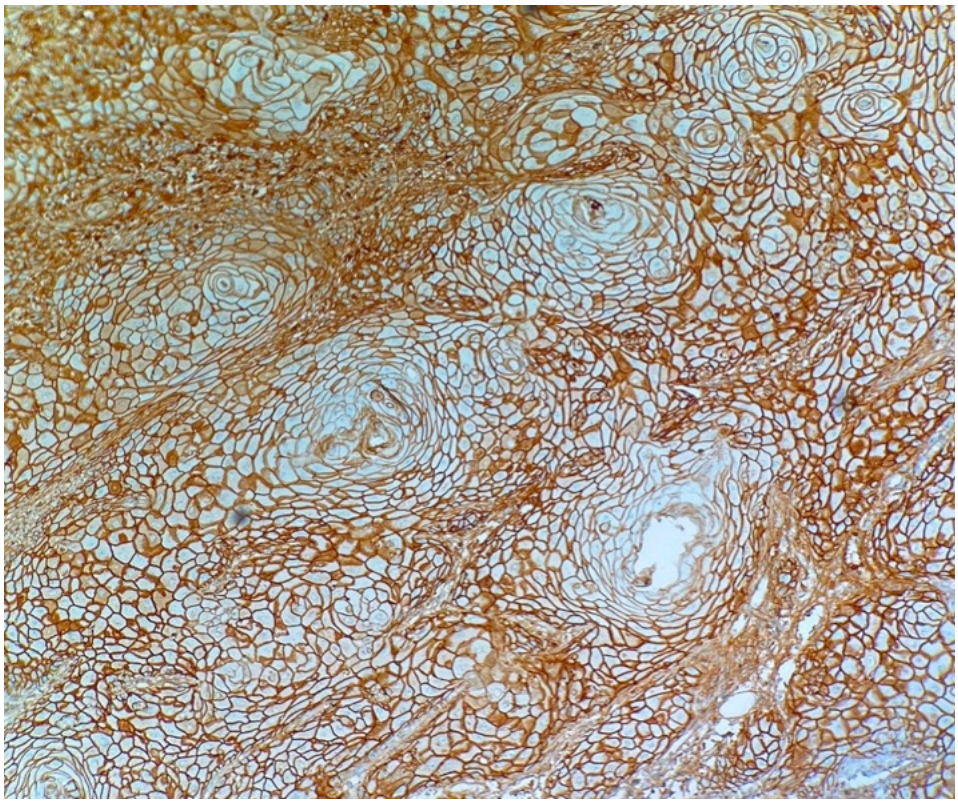

Figura 2 - Corte microscópico representativo da expressão imuno-histoquímica da E-caderina preservada no epitélio tumoral (CEP), em que aproximadamente 100% das células são fortemente positivas para este marcador.

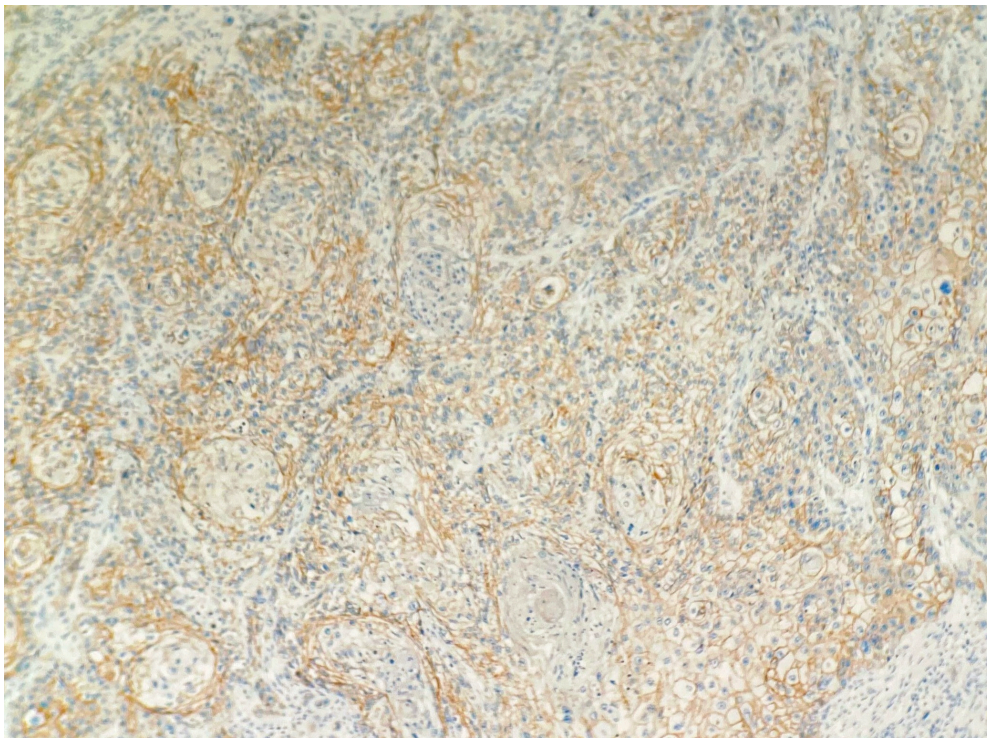

Figura 3 - Corte de microscopia óptica em aumento de 10 vezes de neoplasia de pênis em que a E-caderina mostrou-se com uma perda leve da expressão imuno-histoquímica.

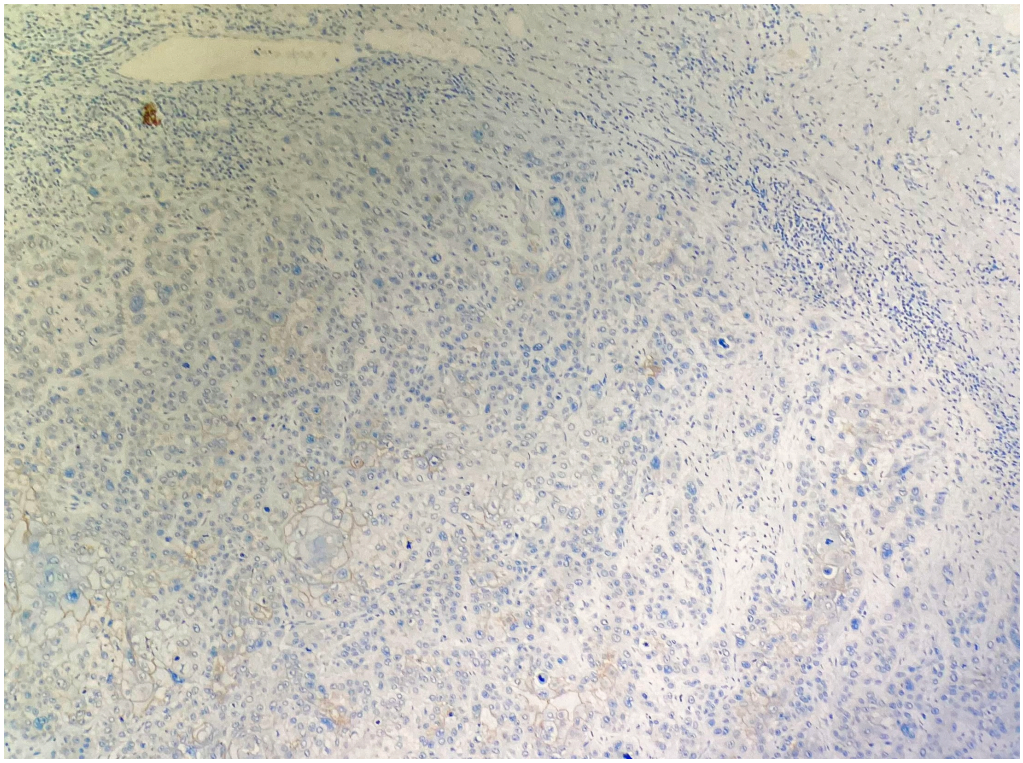

Figura 4 - Imagem microscópica mostrando perda acentuada da expressão imuno-histoquímica da E-caderina no CEP em aumento de 10 vezes.

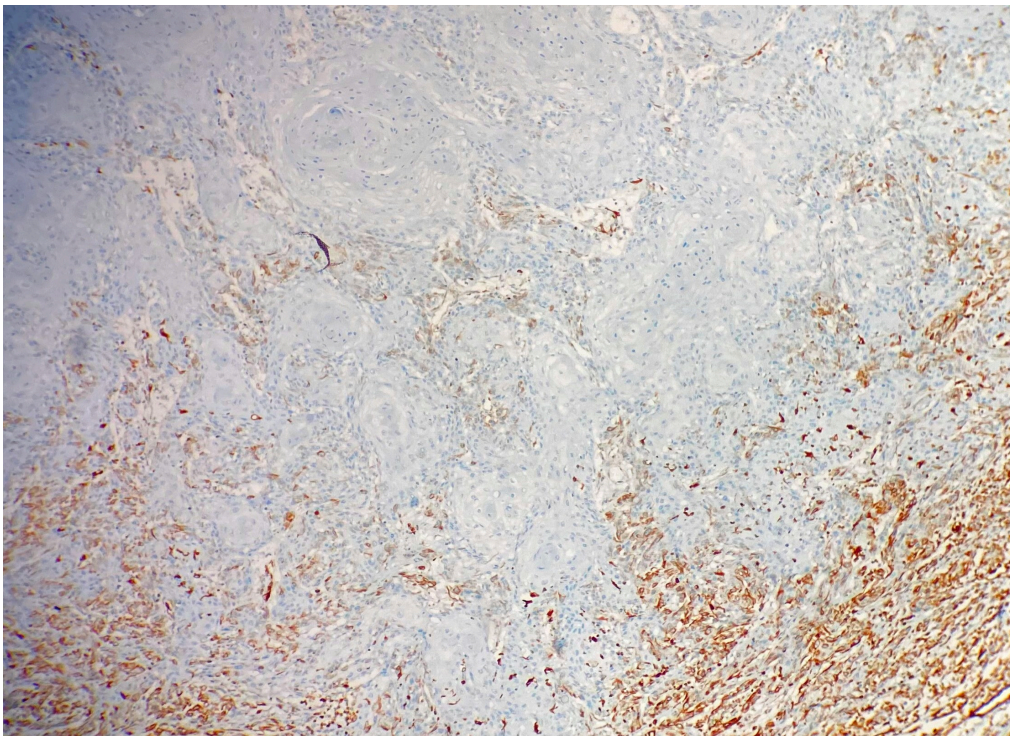

Figura 5 – Tumor de pênis com ausência de expressão imuno-histoquímica de vimentina (microscopia óptica - aumento de 10 vezes).

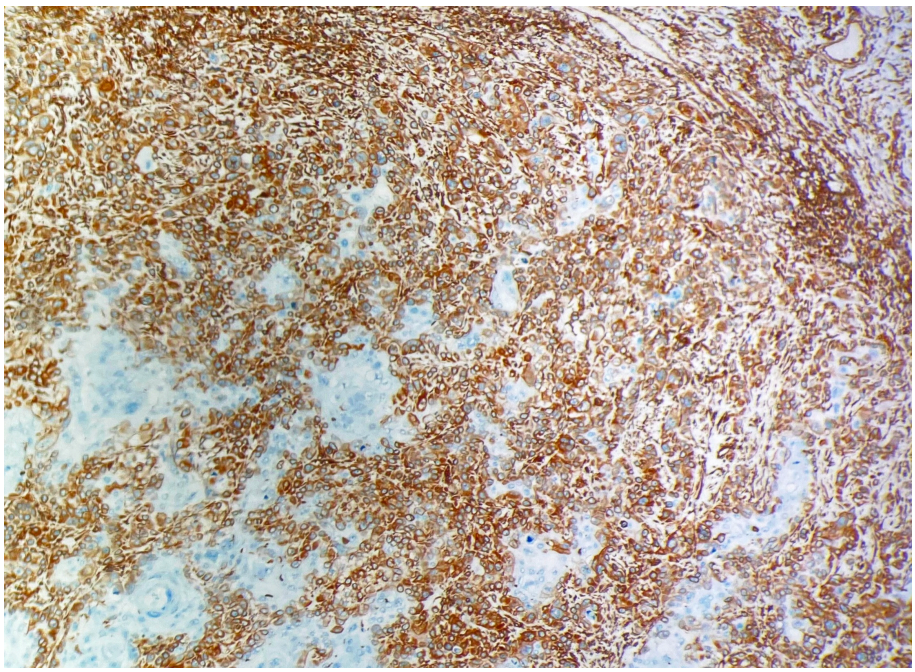

Figura 6 - Imagem de neoplasia de pênis com expressão imuno-histoquímica positiva de vimentina (microscopia óptica - aumento de 10 vezes).

Tabela 3 – Distribuição quanto às variáveis clinicopatológicas dos 81 pacientes portadores de CEP estudados – A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	N	Frequência (%)
Estádio T clínico		
T1a	03	4,8
T1b	06	9,5
T2	29	46
T3	23	36,5
T4	02	3,2
Ignorado/não avaliável	18	
Estádio N clínico		
N0	34	54,8
N1	05	8,0
N2	23	37,1
Ignorado/não avaliável	19	
Estádio TNM 7ª ed.		
I	04	6,3
II	30	47,6
IIIa	05	7,9
IIIb	22	34,9
IV	02	3,2
Ignorado/não avaliável	18	
Subtipo histológico		
CEC (carcinoma epidermóide usual)	60	74,1
Warty	04	4,9
papilar	05	6,2
Pseudoglandular	05	6,2
Cunilatum	02	2,5
Warty-basalóide	01	1,2
Outros	04	4,9
Grau histológico		
Baixo	17	26,5
Moderado	19	29,7
Alto	28	43,8
Ignorado/não avaliável	17	
Invasão vascular		
Negativo	64	83,1
Positivo	13	16,9
Ignorado/não avaliável	04	
Invasão perineural		
Negativo	60	77,9
Positivo	17	22,1
Ignorado/não avaliável	04	
Linfadenectomia		
Não realizada	49	60,5
Inguinal	18	22,2
Inguino-ilíaca	14	17,3
Fronte de invasão		
expansivo	19	23,5
infiltrativo	62	76,5
Vimentina na fronte de invasão		

Cont/ Tabela 3

Variável	N	Frequência (%)
Negativo	43	69,4
Positivo	19	30,6
Ignorado/não avaliável	19	
Vimentina no centro tumoral		
Negativo	57	91,9
Positivo	05	8,1
Ignorado/não avaliável	19	
E-caderina na fronte de invasão		
Negativo	17	34,7
Positivo	32	65,3
Ignorado/não avaliável	32	
E-caderina no centro tumoral		
Negativo (perda leve)	03	6,1
Negativo (perda acentuada)	10	20,4
Positivo	36	73,5
Ignorado/não avaliável	32	
Estadio patológico T		
Tis	01	1,6
T1a	14	22,6
T1b	02	3,2
T2	34	54,8
T3	09	14,5
T4	02	3,2
Ignorado/não avaliável	19	
Invasão de corpo cavernoso		
negativo	31	54,4
Positivo	26	45,6
Ignorado/não avaliável	24	

O subtipo histológico mais comum foi o CEC usual, observado em 60 (74,1%) pacientes, seguido pelos tumores do tipo papilar e pseudoglandular, identificados em 5 (6,2%) pacientes cada um destes. Quanto ao grau de diferenciação tumoral, encontramos 17 (26,5%) pacientes com tumores de baixo grau, 19 (29,7%) pacientes com grau moderado e 28 (43,8%) pacientes com alto grau de diferenciação tumoral. A invasão vascular microscópica foi observada no tumor primário de 13 (16,9%) dos pacientes. A invasão perineural foi detectada na peça cirúrgica de 17 (22,1%) dos pacientes.

O padrão expansivo foi encontrado em 19 (23,5%) pacientes, enquanto que o padrão microscópico infiltrativo foi constatado em 62 (76,5%) integrantes da amostra estudada.

O marcador vimentina foi positivo no centro tumoral de cinco (8,1%) pacientes avaliáveis. Na fronte de invasão tumoral, a expressão imuno-histoquímica da vimentina foi positiva em 19 (30,6%) dos pacientes. A E-caderina esteve negativa no centro tumoral em 13 (26,5%) pacientes, sendo uma perda de expressão imuno-histoquímica leve em 3 (6,1%) e

acentuada em 10 (20,4%) pacientes. Na fronte de invasão, a E-caderina foi negativa na peça tumoral de 17 (34,7%) pacientes. Estes dados são apresentados na **Tabela 3**.

A análise agrupada da expressão imuno-histoquímica da E-caderina no centro e na fronte de invasão tumoral mostrou que em 13 (26,53%) pacientes este marcador foi negativo, e positivo em 32 (65,3%) do total de pacientes avaliáveis. Em 4 (8,16%) pacientes a E-caderina mostrou-se positiva no centro tumoral e negativa nas margens tumorais. Quando analisamos de forma agrupada, isto é, a positividade da vimentina tanto nas margens tumorais como no centro tumoral, verificamos que o marcador foi positivo em 5 (8,06%) pacientes, ao passo em que 43 (69,35%) pacientes este marcador foi negativo tanto na fronte de invasão como no centro tumoral. Estas informações são apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Distribuição da amostra considerada de acordo com a análise da imunoexpressão ide E-caderina e vimentina agrupada (fronte de invasão e centro tumoral). A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	E-caderina (fronte de invasão e centro tumoral)		Vimentina (fronte de invasão e centro tumoral)	
Categoria	n	%	n	%
Positivo	32	65,30	05	8,06
Negativo	13	26,53	43	69,35
Negativo/positivo Ou positivo/negativo	04	8,16	14	22,58
Não avaliável	32	----	19	----

Tabela 5 - Associações entre as diferentes variáveis referentes ao tumor primário e à expressão imuno-histoquímica da vimentina e da E-caderina na fronte de invasão tumoral. A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	**vimentina**		**p(Fischer)**	**E-caderina**		**p (Fisher)**
	negativo	positivo		positivo	negativo (perda leve ou acentuada)	
Linfadenectomia			0,187			0,1
Não realizada	29	08		23	07	
Inguinal	08	08		08	08	
Inguino-ilíaca	06	02		01	02	
Ignorado/não avaliável	20			32		
Invasão perineural			0,207			**0,02**
Ausente	32	12		27	09	
Presente	08	07		03	07	
Ignorado/não avaliável	22			35		
Estadio clínico TNM			0,85			0,945
I	02	0		03	0	
II	17	04		11	04	
IIIa	03	0		02	0	
IIIb	12	05		07	03	
IV	02	0		02	0	
Ignorado/não avaliável	36			49		
Grau de diferenciação			0,06			0,773
Baixo	08	04		07	01	
Moderado	12	0		07	02	
Alto	14	07		11	05	
Ignorado/não avaliável	36			48		
Invasão vascular			0,416			1,0
Negativa	36	15		25	14	
Positiva	04	04		05	02	
Ignorado/não avaliável	22			35		
Fronte de invasão			0,118			0,175
expansivo	13	02		10	02	
infiltrativo	30	17		22	15	
Ignorado/não avaliável	19			32		

Tabela 6 - Associações entre as diferentes variáveis relacionadas ao tumor primário e a expressão imuno-histoquímica da vimentina e da E-caderina no centro tumoral. A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	**vimentina**		**p(Fischer)**	**E-caderina**		**p (Fisher)**
	negativo	positivo		positivo	negativo (perda leve ou acentuada)	
Linfadenectomia			**0,005**			**0,015**
Não realizada	38	0		26	04	
Inguinal	12	04		09	07	
Inguino-ilíaca	07	01		01	02	
Ignorado/não avaliável	19			32		
Invasão perineural			**0,013**			**0,02**
Ausente	43	01		29	07	
Presente	11	04		04	06	
Ignorado/não avaliável	22			35		
Estadio clínico TNM			0,427			1
I	02	0		03	0	
II	21	0		13	02	
IIIa	03	0		02	0	
IIIb	15	02		08	02	
IV	02	0		02	0	
Ignorado/não avaliável	36			49		
Grau de diferenciação			1,0			1,0
Baixo	11	01		07	01	
Moderado	12	0		08	01	
Alto	20	01		13	03	
Ignorado/não avaliável	36			48		
Invasão vascular			0,131			0,654
Negativa	48	03		27	12	
Positiva	06	02		06	01	
Ignorado/não avaliável	22			35		
Fronte de invasão			0,323			0,142
expansivo	15	0		11	01	
infiltrativo	42	05		25	12	
Ignorado/não avaliável	19			32		

Tabela 7 – Associações entre as diferentes variáveis referentes ao tumor primário e à expressão imuno-histoquímica da vimentina e da E-caderina no centro tumoral e fronte de invasão analisadas de forma agrupada. A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	**Vimentina**		**p (Fischer)**	**E-caderina**		**p (Fisher)**
	negativo	positivo		positivo	negativo	
Linfadenectomia			**0,021**			0,064
Não realizada	29	0		23	04	
Inguinal	04	04		08	07	
Inguino-ilíaca	06	01		01	02	
Negativo/positivo				04		
Ou positivo/negativo	14					
Ignorado/não avaliável	23			32		
Invasão perineural			**0,032**			**0,03**
Ausente	32	01		27	07	
Presente	08	04		03	06	
Negativo/positivo	14			04		
Ou positivo/negativo						
Ignorado/não avaliável	22			34		
Estadio clínico TNM			0,785			0,983
I	02	0		03	0	
II	17	0		11	02	
IIIa	03	0		02	0	
IIIb	12	02		07	02	
IV	02	0		02	0	
Negativo/positivo	14			04		
Ou positivo/negativo						
Ignorado/não avaliável	29			48		
Grau de diferenciação			0,139			0,655
Baixo	08	01		07	02	
Moderado	12	0		07	01	
Alto	14	01		11	03	
Negativo/positivo	14			04		
Ou positivo/negativo						
Ignorado/não avaliável	31			46		

Cont/ Tabela 7

Variável	Vimentina		p (Fischer)	E-caderina		p (Fisher)
Invasão vascular			0,161			0,382
Negativa	36	03		25	12	
Positiva	04	02		05	01	
Negativo/positivo Ou positivo/negativo	14			04		
Ignorado/não avaliável	22			32		
Fronte de invasão			0,294			0,499
expansivo	13	0		10	01	
infiltrativo	30	05		22	12	
Negativo/positivo Ou positivo/negativo	14			04		
Ignorado/não avaliável	19			32		

Durante o seguimento ocorreram 30 óbitos e a taxa de SG em 10 anos foi 69,2%, conforme ilustrado na **Figura 7**.

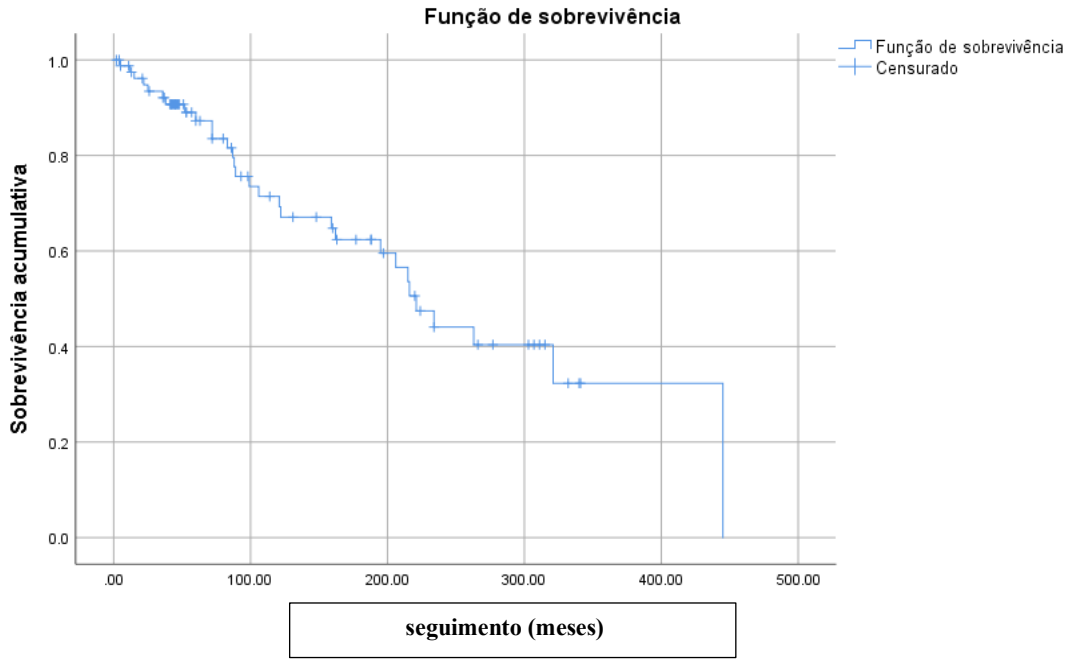

Figura 7 – Curva de sobrevida global em 176 meses de seguimento médio para os pacientes estudados.

Dentre as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas, a realização ou não e, o tipo de linfadenectomia regional realizado influenciaram a SG (p= 0,001), assim como o estadio pT (p=0,046), como demonstrado nas **Figuras 8** e **9**. Pacientes submetidos a linfadenectomia inguino-ilíaca apresentaram pior SG (50%) quando comparados aos submetidos a LI (61,1%). Os pacientes não submetidos a linfadenectomia apresentaram melhor SG no seguimento analisado (67,3%).

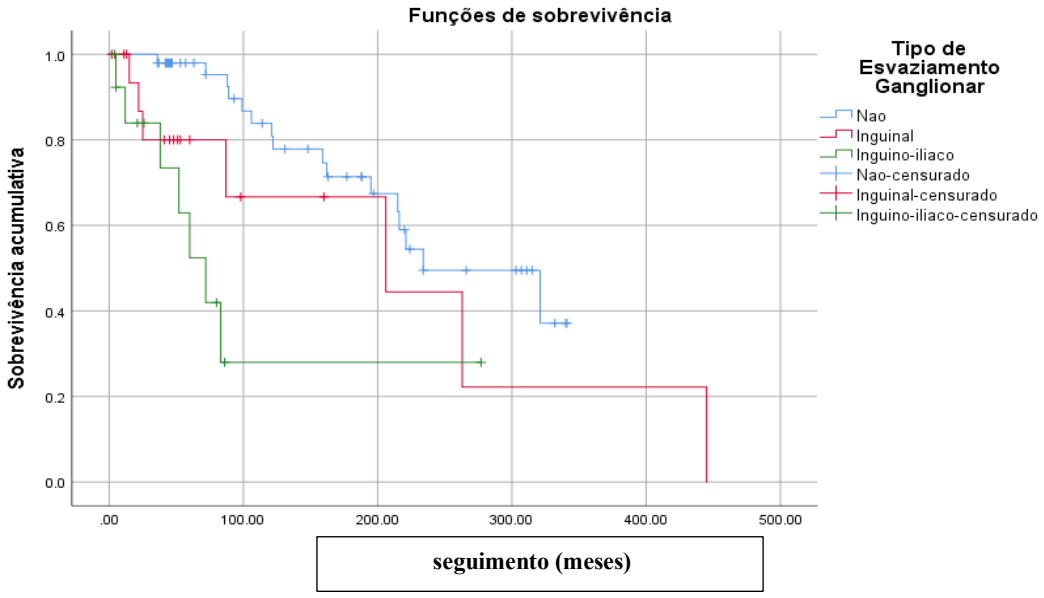

Figura 8 – Curva de sobrevida global para os pacientes estudados estratificados de acordo com a realização ou não de linfadenectomia regional, e extensão do esvaziamento, quando realizado (log rank p= 0,001).

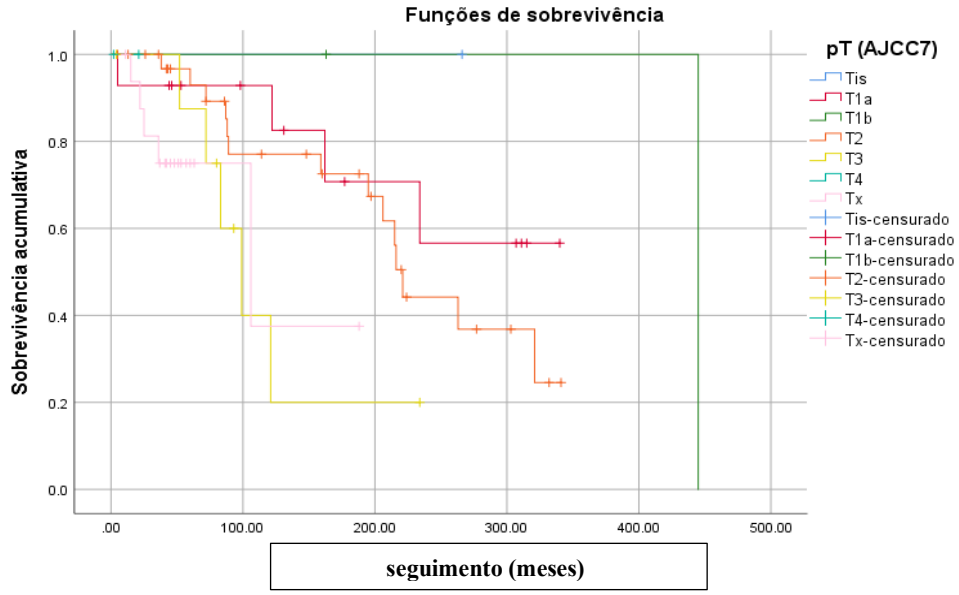

Figura 9 – Curva de sobrevida global para os pacientes estudados estratificados pelo estádio patológico T (log rank p= 0,046).

A **Tabela 8** demonstra a probabilidade de SG no seguimento médio de 176 meses (IC 95%: 144,6 - 207,5 meses) conforme as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas estudadas.

Tabela 8 – Probabilidade acumulada de SG no seguimento analisado de acordo com as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas. A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	n	SG (%)	p (log rank)
Vimentina no centro tumoral	positivo	05	80	0,849
	negativo	57	66,7	
	não avaliável	19	--	
Vimentina na fronte de invasão	positivo	19	57,9	0,319
	negativo	43	72,1	
	não avaliável	19	--	
E-caderina no centro tumoral				
	negativo(perda leve)	03	100	0,783
	negativo(perda acentuada)	10	65,3	
	positivo	36	90	
	não avaliável	32	--	
E-caderina na fronte de invasão	negativo	17	82,4	0,365
	positivo	32	56,3	
	não avaliável	32	---	
Linfadenectomia				
	Não realizada	49	67,3	**0,001**
	Inguinal	18	61,1	
	Inguino-ilíaco	14	50	
Invasão vascular	negativo	64	65,6	0,497
	positivo	13	46,2	
	não avaliável	04	---	
Invasão perineural	negativo	60	63,3	0,086
	positivo	17	58,8	
	não avaliável	04	----	
Fronte de invasão	infiltrativo	46	56,5%	0,976
	expansivo	14	50,0%	
	não avaliável	21	---	
Estadio patológico T				**0,046**
	Tis	01	100	
	T1a	14	71,4	
	T1b	02	50	
	T2	34	58,8	
	T3	09	44,4	
	T4	02	100	
	não avaliável	19	---	
Invasão de corpo cavernoso	ausente	31	58,1	0,813
	presente	26	69,2	
	não avaliável	24	---	

O modelo de regressão de Cox para o cálculo do risco relativo de óbito em relação à realização ou não e do tipo de linfadenectomia realizada na amostra estudada (**Tabela 9**) mostrou que a realização de linfadenectomia inguino-ilíaca foi fator prognóstico adverso para risco de morte (p=0,001; HR 5,055; IC 95% (1,998 – 12,788)).

Tabela 9 – Risco de óbito em pacientes submetidos ou não à linfadenectomia no modelo de regressão de Cox. A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	HR	IC 95%
Linfadenectomia			
	Não realizada	1	Ref.
	inguinal	2,029	0,789 – 5,217
	Inguino-ilíaca	**5,055**	**1,998 – 12,788**

4.1 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA (SLD)

No seguimento médio de 176 meses (IC 95%: 144,6 - 207,5 meses) a SLD no grupo estudado foi de 92,5%, como ilustrado na **Figura 10**. Houve seis recidivas, sendo uma local, quatro à distância (ossos e pulmões) e uma recidiva inguinal. Destes pacientes recidivados, três tiveram morte específica, um morreu por outra causa e dois estavam vivos sem sinais de recidiva até a data do último seguimento.

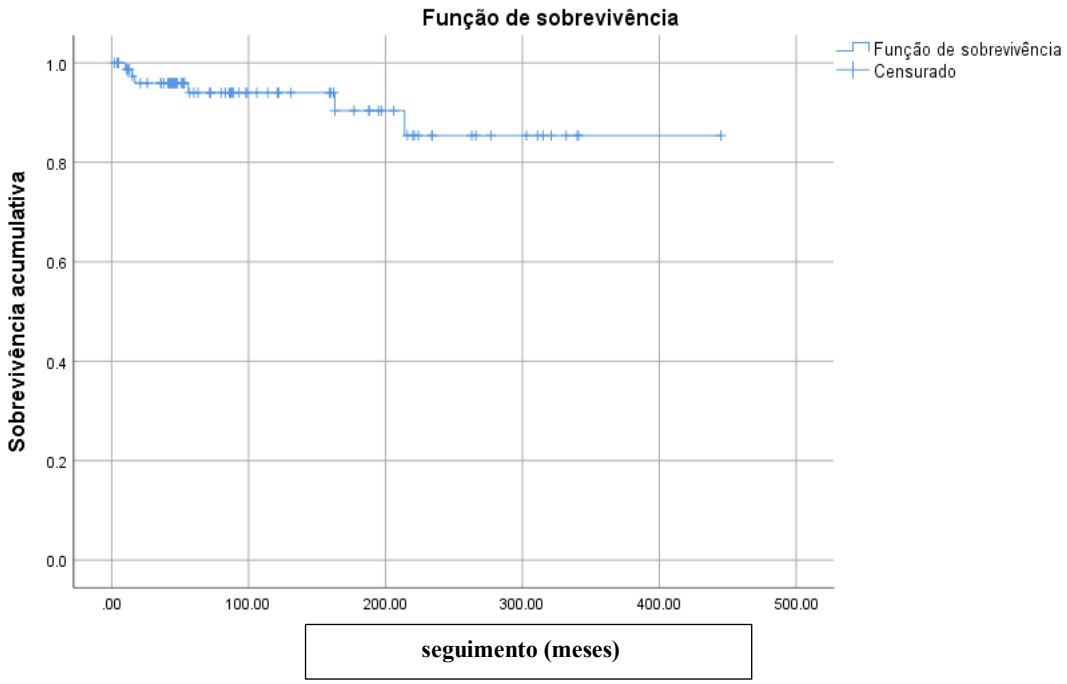

Figura 10 – Curva de sobrevida livre de doença em 176 meses de seguimento médio para a amostra estudada.

Dentre as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas, apenas a supressão da expressão imuno-histoquímica da E-caderina na fronte de invasão e a presença de IPN no tumor primário influenciaram a SLD (log rank p=0,012; log rank p=0,018, respectivamente). As **Figuras 11** e **12** ilustram as curvas de SLD de acordo com a expressão imuno-histoquímica da E-caderina na fronte de invasão e de acordo com a presença de IPN. A **Tabela 10** apresenta a probabilidade de SLD de acordo com as variáveis estudadas.

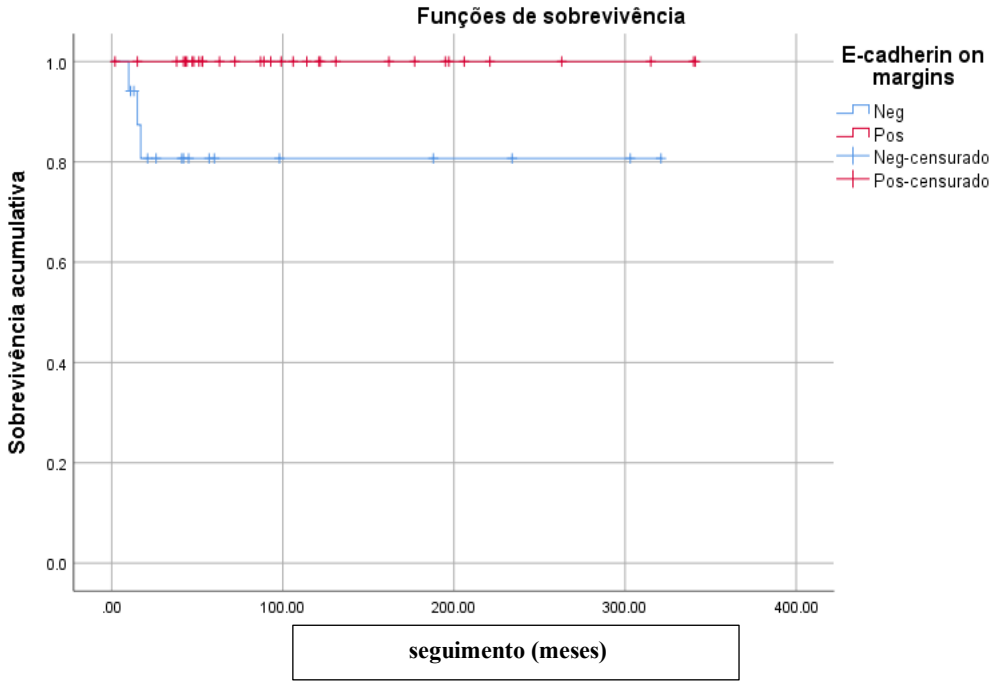

Figura 11 – Curva de sobrevida livre de doença no seguimento médio de 176 meses (IC 95%: 144,6 - 207,5 meses) para a amostra estudada estratificada de acordo com a expressão imuno-histoquímica da E-caderina (log rank p=0,012).

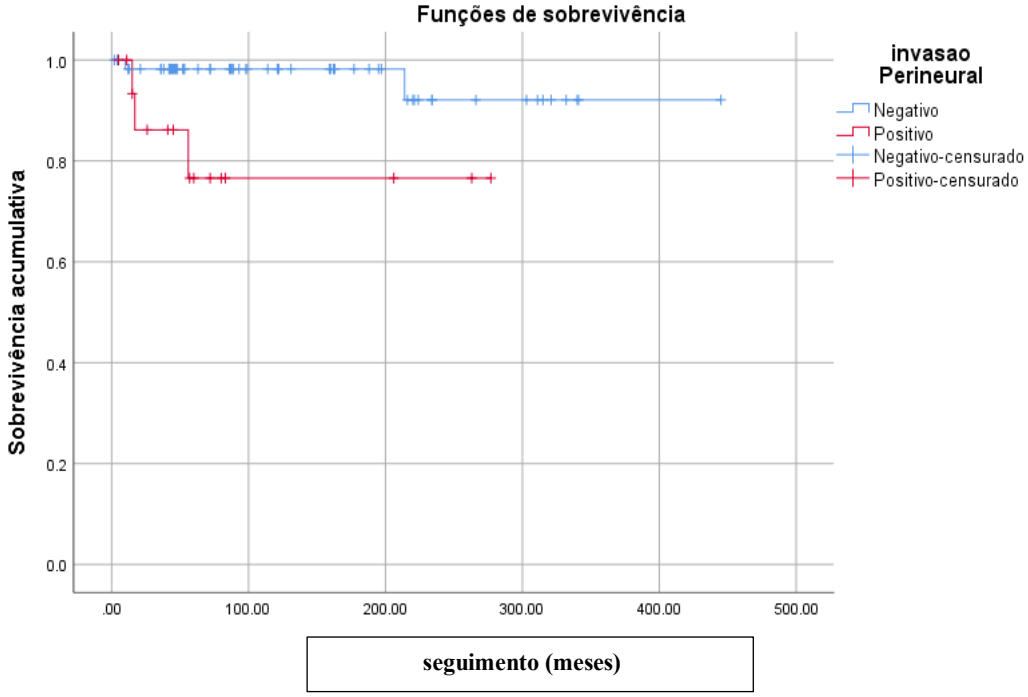

Figura 12 – Curva de sobrevida livre de doença no seguimento analisado para a amostra estudada estratificada de acordo com a presença de invasão perineural (log rank p=0,018).

Tabela 10 – Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença no seguimento médio de 176 meses (IC 95%: 144,6 - 207,5 meses) de acordo com as variáveis clinicopatológicas de interesse descritas. A.C.Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	n	SLD (%)	p (log rank)
vimentina no centro tumoral	positivo	05	100	0,642
	Negativo	56	94,6	
	não avaliável	20		
vimentina na fronte de invasão	positivo	19	89,5	0,196
	Negativo	42	97,6	
	não avaliável	20		
E-caderina no centro tumoral	Negativo (perda leve)	03	66,7	0,113
	Negativo (perda acentuada)	10	90	
	Positivo	36	97,2	
	não avaliável	32		
E-caderina na fronte de invasão	negativo	17	82,4	**0,012**
	Positivo	32	100	
	não avaliável	32		
Linfadenectomia	Não realizada	49	93,8	
	Inguinal	18	88,9	0,398
	Inguino-ilíaco	14	92,9	
Invasão vascular	negativo	63	92,1	0,31
	positivo	13	100	
	não avaliável	05		
Invasão perineural	negativo	59	96,6	**0,018**
	positivo	17	82,4	
	não avaliável	05		
Estadio patológico T				0,21
	Tis	01	100	
	T1a	14	92,9	
	T1b	02	100	
	T2	33	93,9	
	T3	09	100	
	T4	02	100	
	não avaliável	20		
Invasão de corpo cavernoso				0,633
	Ausente	31	93,5	
	Presente	25	92	
	não avaliável	25		
Fronte de invasão				0,816
	Expansivo	14	92,9	
	infiltrativo	45	95,6	
	não avaliável	22		

4.2 ANÁLISE DE REGRESSÃO DE COX PARA A SLD

No modelo de regressão de Cox, a presença de IPN no tumor peniano foi fator preditor de recidiva tumoral na amostra analisada (p=0,04; HR 6,68; (IC 95% 1,09 – 40,86)) (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Risco relativo de recidiva tumoral no grupo estudado de acordo com a variável invasão perineural. Modelo de regressão de Cox.

Variável	Categoria	HR	IC 95%
Invasão perineural	Ausente	1	Ref
	Presente	**6,68**	**1,09 – 40,86**

4.3 SOBREVIDA CÂNCER ESPECÍFICA (SCE)

A SCE da amostra estudada foi de 96,3% no seguimento descrito (**Figura 13**).

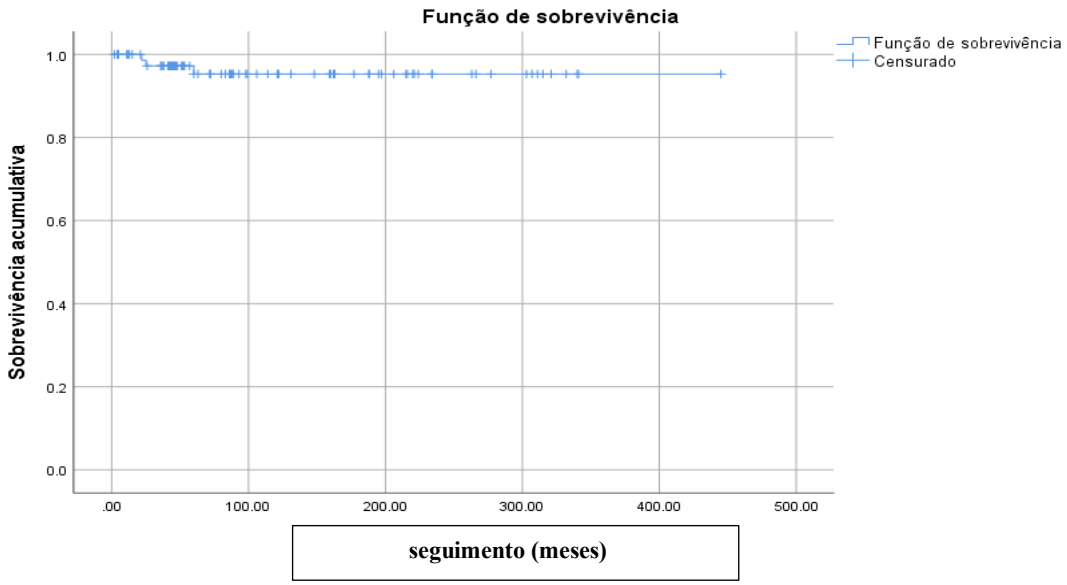

Figura 13 – Curva de sobrevida câncer específica em 176 meses de seguimento médio para a amostra estudada.

Durante o estudo houve 3 óbitos por câncer. Dentre as variáveis epidemiológicas e clinicopatológicas analisadas no estudo, nenhuma influenciou a SCE.

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

A detecção precoce e o tratamento das metástases linfonodais são determinantes de sobrevida no CEP. Até 25% dos pacientes com estádio clínico cN0 têm micrometástases inguinais que, não adequadamente tratadas, evoluem para uma recorrência linfonodal regional num intervalo de tempo de um a dois anos, impactando negativamente na taxa de sobrevida para índices inferiores a 40% em 5 anos (O'Brien et al. 2017; Hakenberg et al. 2018).

Poucas séries avaliaram fatores prognósticos exclusivamente em pacientes sem metástase linfonodal após linfadenectomia (pN0). Em um estudo com 163 pacientes com CEP cN0, a presença de tumores indiferenciados foi sinalizada como fator prognóstico desfavorável independente para SCE (HR 14,08; p = 0,019) (Aita et al. 2016). Entre 101 pacientes com CEP pN0, dos quais 47 foram submetidos à LI bilateral e 54 à linfadenectomia inguino-ilíaca, a presença do padrão infiltrativo na fronte de invasão tumoral foi independentemente associada ao aumento do risco de morte global (HR 2,3; p = 0,007) e de morte específica (HR 11,5; p = 0,019) (Aita et al. 2015).

Uma série holandesa incluiu 342 pacientes com CEP cN0 seguidos por um período mediano de 32 meses. Em análise multivariada, o grau histológico (grau moderado – OR 3,3; IC 95% 1,2 - 8,9; alto grau – OR 4,8; IC 95% 1,7 – 13,7) e a presença de invasão linfovascular (OR 2,1; IC 95% 1,1 – 4,3) no tumor primário foram preditores independentes para a ocorrência de metástases linfonodais (Graafland et al. 2010a). O estudo descrito traz uma informação que merece reflexão. Setenta e dois por cento, isto é, 245 pacientes do total de 342 foram classificados como de alto risco pelos critérios da *EAU Guidelines* (Hakenberg et al. 2015). A incidência de metástases em LNFD inguinais ocultas neste grupo foi de 23%. Isto significa que 188 (77%) pacientes classificados como CEP de alto risco teriam sido submetidos a LI não terapêutica. Quais as razões para esta majoração do envolvimento linfonodal neste grupo de pacientes com CEP de alto risco? Uma possível explicação para isto é o fato de que o grau de diferenciação tumoral e a presença ou não de invasão linfovascular estão associados a uma significativa variabilidade interobservador, justificada por divergências no

processamento e/ou na avaliação diagnóstica das amostras entre os diferentes centros e patologistas (Naumann et al. 2009). Estes fatos ilustram a deficiência e a necessidade de biomarcadores acurados para utilização nesta população de homens com CEP e LNFD clinicamente negativos.

Uma melhor compreensão dos fatores prognósticos no CEP, incluindo-se a expressão de biomarcadores no tumor primário poderá, portanto, auxiliar na tomada de decisão quanto às indicações de LI precoce em pacientes cN0, e/ou o uso de alguma modalidade adjuvante, quando disponível.

No carcinoma escamoso, de forma geral, a eliminação de moléculas de adesão e a transição para o fenótipo mesenquimal possibilitam a progressão da doença do estágio pré-invasivo para uma infiltração de tecidos circunjacentes antes da ocorrência de metástases linfonodais (Cheng et al. 2018). Embora se acreditasse inicialmente que a formação de metástases ocorresse somente em estágios avançados das neoplasias, já se reconhece que a disseminação tumoral e as micrometástases podem ser encontradas também nos estágios iniciais dos tumores (Pradella et al. 2017).

5.2 INVASÃO PERINEURAL

Nesta nossa série de pacientes com CEP pN0 e cN0, a SLD foi influenciada pela perda da imunoexpressão da E-caderina na fronte de invasão tumoral e pela presença de invasão perineural (IPN) no tumor primário (log rank p=0,012; log rank p=0,018, respectivamente).

O presente estudo também revelou que a presença de IPN foi associada a alterações da expressão imuno-histoquímica relacionadas ao processo transição epitélio-mesenquimal (TEM). Este dado mostra a importância do fenômeno de TEM como fator prognóstico adverso para a sobrevida dos pacientes com CEP e LNFD negativos para envolvimento tumoral.

A IPN é definida pela presença de tumor no espaço perineural (Chaux et al. 2009b). O reconhecimento da IPN como um importante fator adverso para recidiva, progressão tumoral e morte específica no CEP foi ratificado pela comunidade científica após a sua inclusão como critério adicional para diferenciar os tumores de pênis pT1a e pT1b na classificação TNM de 2017, 8ª ed. (UICC AJCC) (Cubilla et al. 2016; Paner et al. 2018).

Vários estudos evidenciaram que a presença de IPN no tumor primário está associada à ocorrência mais frequente de metástases linfonodais no CEP e maior mortalidade (Velazquez et al. 2008; Chaux et al. 2009b, 2010; Mentrikoski et al. 2014).

Por outro lado, em uma amostra de 76 pacientes com CEP pT1, a presença de IPN não foi correlacionada à detecção de metástases linfonodais e não foi determinante de pior sobrevida (Mannweiler et al. 2013).

Em uma coorte com 196 pacientes com CEP, Ornellas et al. (2008) realizaram análise univariada e constataram que a confirmação de IPN no tumor primário foi um fator prognóstico preditor de metástases linfonodais (p=0,0092). Uma metanálise incluindo 1.001 pacientes com CEP, dos quais 298 eram positivos para IPN mostrou que este marcador foi associado a uma maior chance de metástase linfonodal (HR 2,98; IC 95% 2,00–4,4), pior SCE (HR 3,58; IC 95% 1,70–7,55) e maior probabilidade de morte por câncer (HR 2,20; IC 95% 1,06–3,82) (Zhou et al. 2018).

Em 2021, Vale et al. analisaram retrospectivamente uma coorte de 65 pacientes com CEP e, em análise multivariada, certificaram que a IPN, uma vez presente no tumor primário, aumentava a chance de morte global (HR 12,7; IC 95% 1,4 – 112,0; p =0,023) de forma significativa.

Numa série que reuniu 411 pacientes chineses e brasileiros com CEP tratados entre 2000 e 2015, Li et al., em 2018 relataram uma SCE de 40,3% em cinco anos para aqueles nos quais se confirmou a presença de IPN no tumor primário, e de 73,3% para os que tinham este marcador ausente no tumor primário.

Nossos resultados a partir deste estudo reforçam o conceito de que a IPN é um preditor independente de recorrência tumoral (HR 6,68; IC 95% 1,09–40,86; p = 0,04). Esta confirmação é especialmente importante dada a facilidade de avaliação do IPN na coloração usual de hematoxilina-eosina e a reprodutibilidade deste critério entre os patologistas. Além disso, deve-se relevar que, enquanto os estudos mencionados acima avaliaram pacientes com LNFD positivos e negativos para envolvimento tumoral (Velazquez et al. 2008; Ornellas et al. 2008; Chaux et al. 2009b, 2010; Mannweiler et al. 2013; Mentrikoski et al. 2014; Li et al. 2018; Vale et al. 2021), nossa série é singular, por avaliar apenas pacientes sem acometimento linfonodal, tanto clínico como patológico.

5.3 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

A TEM é um processo durante o qual células epiteliais perdem características de adesividade intercelular, modificam a polaridade apical-basal e adquirem fenótipo mesenquimal. Estas mudanças morfológicas e na citoarquitetura celular aumentam a capacidade de invasão local, regional e de disseminação à distância (Yang et al. 2020).

Mais recentemente, tem-se demonstrado que a TEM, adicionalmente, é capaz de determinar resistência à apoptose, instabilidade do genoma e menor taxa de resposta ao tratamento sistêmico oncológico (Dongre e Weinberg 2019).

É importante destacar que a TEM não é um fenômeno estanque, em que as células tumorais exibem extremos totalmente epiteliais ou integralmente mesenquimais. Ainda não está claro se este processo inclui espectros fenotípicos de graus variados sem que haja limites distintos entre eles. Estes estados intermediários de TEM podem permitir uma interconversão entre as células que possuem várias combinações de diferentes fenótipos, num processo denominado plasticidade fenotípica (Yang et al. 2020).

Em 73 pacientes com CEP identificou-se uma associação entre o decréscimo da expressão imuno-histoquímica da E-caderina e o envolvimento linfonodal por tumor (p=0,009) (Zhu et al. 2007). Em outro estudo de 125 pacientes com CEP submetidos a amputação peniana e LI bilateral, a supressão da expressão da E-caderina esteve vinculada à presença de metástases inguinais (p=0,032) (Campos et al. 2006).

Em 2015, May et al. relataram os resultados de uma pesquisa envolvendo 60 pacientes com CEP sem metástases e seguidos por um período médio de 34 meses no qual a perda da imunoexpressão da E-caderina foi relacionada à invasão linfovascular no tumor primário (p=0,026). Entretanto, o estudo falhou em mostrar associação entre a perda da expressão imuno-histoquímica da E-caderina e a SCE (May et al. 2015).

Em uma série de 62 casos de CEP, a perda de expressão da E-caderina e o aumento da expressão imuno-histoquímica da vimentina, critérios utilizados para determinar a presença de TEM, foram relacionados a uma maior mortalidade (Masferrer et al. 2015). Do total de casos estudados, 27 (43,5%) reuniram os critérios de TEM e apresentaram maior mortalidade (HR 3,6; IC 95%: 1,02-12,9) e maior recorrência (29,6% x 6,2%, respectivamente; p = 0,017) quando comparados aos casos negativos para TEM. Surpreendentemente, não foi constatada diferença estatisticamente significativa da prevalência de TEM entre tumores metastáticos e

não metastáticos (25% x 15%; p>0,05). Os autores postulam que a falta de associação entre a TEM e o risco de metástase linfonodal sugestiona que o fenômeno TEM favorece uma maior recorrência locorregional no CEP, podendo transpor a via natural de disseminação através dos LNFD regionais. Na série em questão, a avaliação imuno-histoquímica foi feita pela técnica TMA (*tissue microarray*), ao contrário do nosso estudo, em que utilizamos lâmina total. Isso certamente nos permitiu uma avaliação histopatológica mais criteriosa e uma amostra mais representativa do tumor, tanto no seu centro, como na sua fronte de invasão.

Em outro estudo em que se analisou similarmente a TEM na fronte tumoral a partir da perda da imunoexpressão da E-caderina e maior expressão da vimentina em 149 pacientes com CEP, concluiu-se que este processo estava associado a uma pior SCE e pior SG. Os pacientes com o status completo de TEM , definida como a supressão da expressão imuno-histoquímica da E-caderina e o reforço de expressão imuno-histoquímica da vimentina, tiveram sete vezes mais mortes específicas (HR 7,637; IC 95%: 3,153- 18,496; p< 0,001) e três vezes mais mortes globais (HR 3,028; IC 95%: 1,818 - 5,041; p<0,001) do que aqueles cujas neoplasias primárias foram caracterizadas como negativas para o fenômeno de TEM, isto é, em que as expressões imuno-histoquímicas da E-caderina e vimentina foram positivas e negativas, respectivamente (Da Cunha et al. 2016). Neste estudo o processo de TEM também foi associado à presença de IPN no tumor primário (p=0,016) e aos seguintes fatores prognósticos: grau histológico (p<0,0001), padrão de invasão tumoral (p<0,0001), metástases linfonodais (p<0,001 e invasão vascular (p=0,001). Nesta e nas demais séries descritas, estudou-se pacientes tanto com LNFD comprometidos por tumor, quanto negativos, em contraste com nossa população de estudo.

Um achado relevante do nosso estudo foi a associação entre IPN e os marcadores da TEM. A expressão imuno-histoquímica positiva de vimentina no centro tumoral (p=0,013) e em análise agrupada (fronte de invasão e centro tumoral; p = 0,024), a supressão da expressão da E-caderina no centro tumoral (p=0,026) e na fronte de invasão (p=0,02), assim como a análise da E-caderina agrupada no centro e fronte de invasão(p= 0,02) foram associadas à positividade para IPN no tumor primário.

A presença de IPN no CEP associada às alterações típicas da TEM descritas acima pode fornecer importante informação prognóstica em pacientes pN0 e cN0, inclusive na seleção de candidatos a alguma modalidade de adjuvância, quando disponível.

5.4 LINFADENECTOMIA INGUINAL

A realização da LI ou inguino-ilíaca foi fator prognóstico de SG nesta série. Os pacientes submetidos a LI tiveram SG de 61,1% no seguimento estudado. Para os que não realizaram LI, a taxa de SG foi de 67,3%. Aqueles que passaram pela dissecção linfática inguino-ilíaca apresentaram a pior SG comparativamente aos demais, estimada em 50%. No modelo de regressão de Cox, ter sido submetido a linfadenectomia inguino-ilíaca aumentou o risco de óbito em 5 vezes (HR 5,05; IC 95% 1,998–12,788; p = 0,001) em relação aos pacientes cN0.

Racionalmente é difícil estabelecer-se um elo causal envolvendo esta associação, tendo em vista que os LNFD foram histopatologicamente negativos para comprometimento tumoral nesta série. Atribuímos este achado ao fato de que os pacientes submetidos à LI ou inguino-ilíaca certamente apresentavam indicativos de maior agressividade no tumor primário (e exatamente por isso foram submetidos a exploração inguinal), em comparação aos pacientes não submetidos a linfadenectomia, o que está em acordo com outro estudo que desenvolvemos, que já demonstrara taxas superiores de SG, SCE e SLD em 10 anos nos 96 pacientes cN0 (59,7%, 96.4% e 95,2) em comparação aos 165 pacientes pN0 (52,7%, 87,1% e 86,0%; p=0,0049; p = 0,001 e p = 0,025, respectivamente) (Aita 2014).

Neste estudo, a realização de linfadenectomia foi associada também à perda da expressão imuno-histoquímica da E-caderina no centro tumoral (p=0,018) e ao acréscimo da expressão de vimentina tanto no centro tumoral (p=0,005), como em análise conjunta (centro e fronte de invasão; p =0,021). Isto corrobora a hipótese de que o grupo submetido a LI ou à linfadenectomia inguino-ilíaca efetivamente tinha distintivos de maior agressividade biológica no seu tumor primário.

5.5 ESTÁDIO PATOLÓGICO T

O estádio patológico do tumor primário também foi impactante na SG na nossa série. Entretanto, interpretamos este dado com bastante cautela, tendo em vista que não encontramos diferenças nas respectivas taxas de SLD para este mesmo critério.

A SG para os pacientes com CEP pT1a foi de 71,4% no seguimento estudado; 50% para os estadiados como pT1b; 58,8% para os pT2 e 44,4% para os pT3. Tivemos dois pacientes com tumores pT4 que estranhamente obtiveram uma SG de 100% no seguimento analisado. Um

deles foi submetido a penectomia parcial em 28 de agosto de 2016 para tratamento de um CEP subtipo warty com IVM e IPN ausentes, fronte de invasão padrão expansivo e sem qualquer alteração de expressão imuno-histoquímica sugestiva de TEM na fronte ou no centro tumoral. O último seguimento deste paciente foi realizado em 16/11/2016, estando vivo e sem doença. O outro paciente com tumor pT4 foi submetido a penectomia parcial em 22/05/2017 e o último seguimento foi em 22/02/2019, quando estava vivo e sem doença. O tumor deste último era do subtipo histológico papilar; IVM e IPN estavam ausentes; fronte de invasão padrão expansivo; expressão imuno-histoquímica de vimentina positiva nas bordas tumorais e negativa no centro tumoral e expressão de E-caderina negativa no centro e bordas tumorais.

A diferença de SG observada entre os pacientes com estádio pT1a e pT1b reflete a importância da invasão vascular e linfática no tumor primário como fatores prognósticos, tendo em vista que o estadiamento foi feito pelo TNM 7ª ed.(Edge et al. 2009), quando a presença de IPN ainda não havia sido incluída com critério para inclusão no estádio pT1b. Numa série de 411 pacientes com CEP, a invasão angiolinfática foi assinalada como fator preditor independente do risco de morte específica (HR 1,587; IC 95% 1,253 – 2,011; p = 0,001) (Li et al. 2018).

O fato de termos apenas dois pacientes com CEP pT4 na nossa série, cujos tumores primários não apresentaram positividade para IPN ou para o padrão infiltrativo, estes já devidamente reconhecidos como marcadores de desfecho adverso nesta população de homens com CEP, pode justificar a elevada taxa de SG encontrada (Aita et al. 2015).

O impacto do estádio do tumor primário na evolução do CEP é descrito em estudo americano que envolveu 89 homens com CEP seguidos por um período mediano de 23 meses, observando-se menor SG em 5 anos naqueles com tumores pT2-T4, quando comparados aos que tinham tumores pTa-T1 (p=0,008) (Jayaratna et al. 2014). Neste mesmo estudo o estadiamento agrupado TNM 7ª ed. (UICC AJCC Edge et al. 2009) é descrito como preditor independente do risco de morte em 5 anos (p=0,006).

Leijte et al. (2008) retrataram que a sobrevida dos pacientes com CEP estádio T2 é comparável ou até mesmo inferior aos pacientes com lesões T3 (p=0,57). Na série citada, foram estudados 513 pacientes com seguimento mediano de 58,7 meses (3 - 303). Os pacientes com estádio pT2 foram subdivididos em dois grupos: os que apresentavam invasão de corpo esponjoso e aqueles que apresentavam infiltração de corpo cavernoso, e tiveram

suas respectivas taxas de SCE comparadas com os pacientes com tumores pT3. Houve diferença significativa de sobrevida entre os dois subgrupos pT2 (p<0,001). A sobrevida no grupo pT3 (TNM 7ª ed.) foi superior a do grupo de pacientes com invasão de corpo cavernoso (67,7% x 52,6%). De acordo com os autores, a túnica albugínea, pela sua natureza fibroelástica, parece funcionar como barreira contra a disseminação do CEP.

Em 2010b, Graafland et al. apresentaram uma série de 156 homens com CEP que foram seguidos por um período mediano de 57,8 meses e encontraram uma SCE em 5 anos de 60% e 59%, respectivamente para os pacientes com estádios pT2 e pT3-4.

Estes dois últimos estudos, apesar de não atuais, merecem destaque por sua importância e contribuição para a posterior mudança do estadiamento TNM da 7ª ed para 8ª ed., a partir do qual o estádio pT2 passou a designar a invasão tumoral de corpo esponjoso independentemente da existência de invasão uretral associada e, o pT3, invasão de corpo cavernoso, com ou sem invasão uretral (Cubilla et al. 2016; Paner et al. 2018). Entretanto, na nossa pesquisa atual, não identificamos diferença estatisticamente significativa entre a SG (p= 0,813) ou SLD (p =0,633) dos pacientes com CEP categorizados a partir da presença ou ausência de invasão de corpo cavernoso. A nossa limitada casuística (34 casos pT2 e apenas nove pT3) pode ter influenciado a ausência de diferença estatística entre as taxas de sobrevida mencionadas acima.

5.6 LIMITAÇÕES E IMPACTO NA PRÁTICA CLÍNICA

A análise microscópica dos padrões expansivo e infiltrativo na fronte de invasão tumoral descrita em nosso estudo anterior (Aita et al. 2015), assim como a análise de IPN são de baixo custo e fazem parte da Anatomopatologia cotidiana. A adição da análise imuno-histoquímica sabidamente traz custos adicionais, mas já pode ser considerada parte integrante das rotinas de centros oncológicos terciários e, em geral, com cobertura pelos sistemas de saúde suplementar ou até mesmo pelo sistema público no Brasil.

O presente estudo tem limitações. É uma coorte limitada e de natureza retrospectiva. A maioria (46 (56,8%)) dos pacientes arrolados no estudo foram tratados antes da década de 80. Adicionalmente, uma parcela substancial das peças cirúrgicas não pôde ser submetida à análise imuno-histoquímica pela limitação da quantidade de material parafinado disponível nos blocos tumorais, os quais já haviam sido seccionados diversas vezes para múltiplas

pesquisas anteriores na instituição. Adicionalmente, o desgaste do material motivado pelo tempo certamente contribuiu para a perda de antigenicidade tecidual em nosso estudo. Isto acrescido ao pequeno número de eventos de morte específica e recidiva pode explicar a ausência de impacto dos biomarcadores estudados nas curvas de SCE e de SG. A evolução dos protocolos de tratamento ao longo dos anos também pode ter influenciado as taxas de recorrência e mortalidade observadas.

A forma de detecção de metástases linfonodais em pacientes com CEP cN0 mudou nas últimas décadas, passando de uma observação vigilante para a exploração inguinal simplificada ou através da biópsia dinâmica do LNFD sentinela (Johnston e Nigam, 2019). Até o final da década de 1980, os pacientes com CEP cN0 eram tratados com exame físico periódico dos LNFD inguinais, enquanto os pacientes com LNFD clinicamente positivos eram submetidos a penectomia acrescida de LI radical bilateral. Após o devido reconhecimento da informação prognóstica do marcador invasão linfática e vascular na neoplasia primária (Djajadiningrat et al. 2014; Hakenberg et al. 2015), iniciou-se a indicar a LI precoce ou profilática nos tumores com estádio pT1 de alto grau e naqueles com estadiamento maior que pT1. Mais recentemente, a presença de IPN no tumor primário foi incluída no estágio pT1b, corroborando a percepção da relevância deste marcador como fator de mau prognóstico na evolução do CEP (Paner et al. 2018).

Quiçá numa série maior e multicêntrica formada por pacientes com CEP cN0 e pN0 pudéssemos testar novamente os marcadores vimentina e E-caderina, a IPN, o grau histológico e o padrão da fronte de invasão para definir com maior acurácia seus papéis prognósticos de forma isolada e em duplas ou tríades de fatores de risco. Isso permitirá estratificar dentre este grupo de pacientes aqueles merecedores de seguimento clínico mais rigoroso e frequente e, quando disponível, oferecer-lhes terapia adjuvante à penectomia ou à LI.

Interessante também será investigar o acréscimo da avaliação da infecção por HPV neste perfil de pacientes com CEP. Alguns estudos têm demonstrado que o HPV, quando presente, pode ser um indutor da TEM, favorecendo a perda da expressão membranosa da E-caderina através das proteínas virais E6 e E7 ou por meio da perda do cromossomo 16q, que abriga o gene E-caderina (D'Costa et al. 2012; Masferrer et al. 2015).

Por outro lado, vários fatos valorizam e robustecem os dados obtidos a partir deste estudo. As análises imuno-histoquímicas foram realizadas em lâmina total e contemplaram

tanto o centro tumoral como a fronte de invasão. As células da fronte de invasão tumoral têm o maior potencial de disseminação e, por isso, representam a área mais importante a ser avaliada e mais representativa do fenômeno de TEM (Cheng et al. 2018). Além disso, efetivamos um controle do padrão de normalidade no próprio tumor para a avaliação imuno-histoquímica dos marcadores pesquisados. Por fim, ressaltamos que todos os pacientes tiveram seguimento adequado e, dada a raridade do CEP, é extremamente difícil obter-se séries exclusivas de pacientes cN0 e pN0.

Esta pesquisa reitera, portanto, o conceito de que a ausência de comprometimento linfonodal nem sempre assegura desfechos oncológicos favoráveis no CEP. Entre os pacientes com CEP cN0 e pN0 existem subgrupos que exibem pior prognóstico e um risco maior de recorrência e progressão. Este grupo ainda carece de identificação acurada, que deve ser somada às informações clínicas e patológicas utilizadas na rotina atual.

Na nossa amostra de pacientes com LNFD negativos, seis pacientes apresentaram recidiva tumoral, sendo quatro à distância, uma inguinal e outra no coto peniano remanescente. Destes pacientes recidivados, três tiveram morte específica. O fato da maior parte (66,67%) destas recidivas terem sido observadas fora do sítio cirúrgico reflete um comportamento agressivo da doença. Dentre os três pacientes com morte específica da nossa coorte, os dois nos quais foi possível investigar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores em questão, apresentavam perda da E-caderina na fronte de invasão.

A detecção da ocorrência de TEM e análise da presença de IPN no CEP pode acrescer dados e informações para a aplicação de protocolos de acompanhamento mais rigorosos neste grupo de pacientes. Para o futuro, a identificação imunológica da TEM no tumor primário pode ser útil na seleção de candidatos a ensaios clínicos, ou para o uso de drogas, a exemplo do receptor do fator de crescimento antiepidérmico, ou quimioterapia em contexto adjuvante ou ainda imunoterapia (de Vries et al. 2019; Inan e Hayran 2019; Vanthoor et al. 2021).

6 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que um dos marcadores da TEM, a supressão da expressão imuno-histoquímica de E-caderina na fronte de invasão tumoral foi preditor de menor SLD numa coorte de pacientes com CEP sem envolvimento linfonodal.

Concluímos também que a presença de invasão perineural no tumor primário de pênis além de determinante para a SLD, está associada aos marcadores moleculares de TEM estudados, particularmente à alta expressão de vimentina tanto no centro do tumor como em análise agrupada (centro e fronte de invasão) e à perda de expressão de E-caderina no centro do tumor e na fronte de invasão tumoral.

Faz-se necessário confirmar os presentes achados em estudos prospectivos, multicêntricos e com métodos padronizados de avaliação desses marcadores. Adicionalmente, estes estudos devem aquilatar o impacto da incorporação destes marcadores para estratificação de risco de recidiva tumoral antes que sua aplicação sistemática possa ser recomendada.

7 REFERÊNCIAS

Adashek JJ, Necchi A, Spiess PE. Updates in the molecular epidemiology and systemic approaches to penile cancer. Urol Oncol. 2019 Jul;37(7):403-408.

Aita GA. Características clinicopatológicas e fatores prognósticos em portadores de câncer de pênis com linfonodos negativos submetidos ou não a linfadenectomia inguinal. São Paulo, 2014. Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

Aita G, da Costa WH, de Cassio Zequi S, da Cunha IW, Soares F, Guimaraes GC, Lopes A. Pattern of invasion is the most important prognostic factor in patients with penile cancer submitted to lymph node dissection and pathological absence of lymph node metastasis. BJU Int. 2015 Oct;116(4):584-9.

Aita GA, Zequi SC, Costa WH, Guimarães GC, Soares FA, Giuliangelis TS. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. Int Braz J Urol. 2016 Nov-Dec;42(6):1136-1143.

Albersen M, Spiess PE. Editorial: penile cancer. Curr Opin Urol. 2019 Mar;29(2):143-144.

Alkatout I, Naumann CM, Hedderich J, Hegele A, Bolenz C, Jünemann KP, et al. Squamous cell carcinoma of the penis: predicting nodal metastases by histologic grade, pattern of invasion and clinical examination. Urol Oncol. 2011 Nov-Dec;29(6):774-81.

Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Tumour progression and metastasis. Ecancermedicalscience. 2016 Jan 29;10:617.

Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. Cancer Causes Control. 2009 May;20(4):449-57.

Barski D, Georgas E, Gerullis H, Ecke T. Metastatic penile carcinoma: an update on the current diagnosis and treatment options. Cent Eur J Urol. 2014;67(2):126–32.

Basu D, Nguyen TT, Montone KT, Zhang G, Wang LP, Diehl JA, et al. Evidence for mesenchymal-like subpopulations within squamous cell carcinomas possessing chemoresistance and phenotypic plasticity. Oncogene. 2010 Jul 22;29(29):4170-82.

Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbø J, Nesland JM, et al. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? Anticancer Res. 1998 Nov-Dec;18(6B):4757-64.

Campbell RA, Slopnick EA, Ferry EK, Zhu H, Kim SP, Abouassaly R. Disparity between pre-existing management of penile cancer and NCCN guidelines. Urol Oncol. 2017 Aug;35(8):531.e9-531.e14.

Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. et al. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. Urology. 2006 Apr;67(4):797-802.

Canete-Portillo S, Sanchez DF, Cubilla AL. Pathology of invasive and intraepithelial penile neoplasia. Eur Urol Focus. 2019;5(5):713–717.

Carthon BC, Ng CS, Pettaway CA, Pagliaro LC. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the penis. BJU Int. 2014 Jun;113(6):871-7.

Chahoud J, Kohli M, Spiess PE. Management of advanced penile cancer. Mayo Clin Proc. 2021 Mar;96(3):720-732.

Chaux A, Reuter V, Lezcano C, Velazquez EF, Torres J, Cubilla AL. Comparison of morphologic features and outcome of resected recurrent and nonrecurrent squamous cell carcinoma of the penis: a study of 81 cases. Am J Surg Pathol. 2009a Sep;33(9):1299-306.

Chaux A, Caballero C, Soares F, Guimarães GC, Cunha IW, Reuter V, et al. The prognostic index: a useful pathologic guide for prediction of nodal metastases and survival in penile squamous cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 2009b Jul;33(7):1049-57.

Chaux A, Tamboli P, Ayala A, Soares F, Rodríguez I, Barreto J, et al. Warty-basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm. Report of 45 cases. Mod Pathol. 2010 Jun;23(6):896-904.

Chaux A, Velazquez EF, Barreto JE, Ayala E, Cubilla AL. New pathologic entities in penile carcinomas: an update of the 2004 world Health Organization Classification. Semin Diagn Pathol. 2012 May;29(2):59-66.

Cheng SY, Shi K, Bai XR, Wu QW, Lv XQ. Double-staining of E-cadherin and podoplanin offer help in the pathological diagnosis of indecisive early-invasive oral squamous cell carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2018 Jan 1;11(1):38-47.

Chipollini J, Tang DH, Sharma P, Baumgarten AS, Spiess PE. Patterns of regional lymphadenectomy for clinically node-negative patients with penile carcinoma: analysis from the National Cancer Database From 1998 to 2012. Clin Genitourin Cancer. 2017 Dec;15(6):670-677.e1.

Coelho RW, Pinho JD, Moreno JS, Garbis DVEO, do Nascimento AMT, et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? BMC Urol. 2018 May 29;18(1):50.

Cubilla AL, Ayala A, Ayala G, et al. (2016) Malignant epithelial tumours. In: WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, 8th, Moch H, Humphry PA, Ulbright TN, Reuter VE (Eds), WHO Press, Lyon 8: 262.

da Cunha IW, Souza MJ, da Costa WH, Amâncio AM, Fonseca FP, Zequi Sde C, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncological outcomes. Urol Oncol. 2016 Oct;34(10):433.19-26.

Daubisse-Marliac L, Colonna M, Trétarre B, Defossez G, Molinié F, Jéhannin-Ligier K, et al. Long-term trends in incidence and survival of penile cancer in France. Cancer Epidemiol. 2017 Oct;50(Pt A):125-131.

D'Costa ZJ, Jolly C, Androphy EJ, Mercer A, Matthews CM, Hibma MH. Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. PLoS One. 2012;7(11):e48954

de Vries HM, Ottenhof SR, Horenblas S, van der Heijden MS, Jordanova ES. Defining the tumor microenvironment of penile cancer by means of the cancer immunogram. Eur Urol Focus. 2019 Sep;5(5):718-721.

Djajadiningrat RS, Graafland NM, van Werkhoven E, Meinhardt W, Bex A, van der Poel HG, et al. Contemporary management of regional nodes in penile cancer-improvement of survival? J Urol. 2014 Jan;191(1):68-73.

Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Feb;20(2):69-84.

Douglawi A, Masterson TA. Updates on the epidemiology and risk factors for penile cancer. Transl Androl Urol. 2017 Oct;6(5):785-790.

Edge SB, Byrd DR, Compton C, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC cancer staging manual. New York: Springer; 2009. Penis; p.447-56.

Epstein JH, Cubilla AL, Humphrey PA. Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, penis, and scrotum. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology; 2011. p.405-612. (AFIP Atlas of Tumor Pathology: Series 4)

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. Int Braz J Urol. 2008 Sep-Oct;34(5):587-91; discussion 591-3.

Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res. 2017 May 1;7(5):1016-1036.

Graafland NM, Lam W, Leijte JA, Yap T, Gallee MP, Corbishley C, et al. Prognostic factors for occult inguinal lymph node involvement in penile carcinoma and assessment of the high-risk EAU subgroup: a two-institution analysis of 342 clinically node-negative patients. Eur Urol. 2010a Nov;58(5):742-7.

Graafland NM, van Boven HH, van Werkhoven E, Moonen LM, Horenblas S. Prognostic significance of extranodal extension in patients with pathological node positive penile carcinoma. J Urol. 2010b Oct;184(4):1347-53.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, Zequi Sde C, Leal ML, Carvalho AL, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. Urology. 2006 Jul;68(1):148-53.

Hakenberg OW, Compérat EM, Minhas S, Necchi A, Protzel C, Watkin N. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. Eur Urol. 2015 Jan;67(1):142-150.

Hakenberg OW, Dräger DL, Erbersdobler A, Naumann CM, Jünemann KP, Protzel C. The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer. Dtsch Arztebl Int. 2018 Sep 28;115(39):646-652.

Hansen BT, Orumaa M, Lie AK, Brennhovd B, Nygård M. Trends in incidence, mortality and survival of penile squamous cell carcinoma in Norway 1956-2015. Int J Cancer. 2018 Apr 15;142(8):1586-1593.

Heyns CF, Mendoza-Valdes A, Pompeo AC. Diagnosis and staging of penile cancer. Urology. 2010;76(2 Suppl 1):S15–23.

Hu J, Cui Y, Liu P, Zhou X, Ren W, Chen J, Zu X. Predictors of inguinal lymph node metastasis in penile cancer patients: a meta-analysis of retrospective studies. Cancer Manag Res. 2019 Jul 10;11:6425-6441.

Inan S, Hayran M. Cell signaling pathways related to epithelial mesenchymal transition in cancer metastasis. Crit Rev Oncog. 2019;24(1):47-54.

Jain AP, Patel K, Pinto S, Radhakrishnan A, Nanjappa V, Kumar M, et al. MAP2K1 is a potential therapeutic target in erlotinib resistant head and neck squamous cell carcinoma. Sci Rep. 2019 Dec 11;9(1):18793.

Jayaratna IS, Mitra AP, Schwartz RL, Dorff TB, Schuckman AK. Clinicopathologic characteristics and outcomes of penile cancer treated at tertiary care centers in the Western United States. Clin Genitourin Cancer. 2014 Apr;12(2):138-42.

Johnston MJ, Nigam R. Recent advances in the management of penile cancer. F1000Res. 2019 Apr 26;8:F1000 Faculty Rev-558.

Jolly MK, Boareto M, Huang B, Jia D, Lu M, Ben-Jacob E, et al. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. Front Oncol. 2015 Jul 20;5:155.

Jolly MK, Ware KE, Gilja S, Somarelli JA, Levine H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? Mol Oncol. 2017 Jul;11(7):755-769.

Kalluri R, Weinberg RA. The basis os epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009 Jun;119(6):1420-8. Erratum in: J Clin Invest. 2010 May 3;120(5):1786.

Kang KW, Lee MJ, Song JA, Jeong JY, Kim YK, Lee C, et al. Overexpression of goosecoid homeobox is associated with chemoresistance and poor prognosis in ovarian carcinoma. Oncol Rep. 2014 Jul;32(1):189-98.

Leijte JA, Gallee M, Antonini N, Horenblas S. Evaluation of current TNM classification of penile carcinoma. J Urol. 2008 Sep;180(3):933-8.

Li H, Ma Y, Jian Z, Jin X, Xiang L, Li H, et al. Lymph node dissections for t3t4 stage penile cancer patients without preoperatively detectable lymph node metastasis bring more survival benefits: a propensity matching analysis. Front Oncol. 2021 Sep 24;11:712553.

Li M, Zhang B, Sun B, Wang X, Ban X, Sun T, et al. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. J Exp Clin Cancer Res Res. 2010 Aug 11;29(1):109.

Li ZS, Ornellas AA, Schwentner C, Li X, Chaux A, Netto G, et al. A modified clinicopathological tumor staging system for survival prediction of patients with penile cancer. Cancer Commun (Lond). 2018 Nov 23;38(1):68.

Luo Y, Yu T, Zhang Q, Fu Q, Hu Y, Xiang M, et al. Upregulated N-cadherin expression is associated with poor prognosis in epithelial-derived solid tumours: a meta-analysis. Eur J Clin Invest. 2018 Apr;48(4):e12903.

Mannweiler S, Sygulla S, Tsybrovskyy O, Razmara Y, Pummer K, Regauer S. Clear-cell differentiation and lymphatic invasion, but not the revised TNM classification, predict lymph node metastases in pT1 penile cancer: a clinicopathologic study of 76 patients from a low incidence area. Urol Oncol. 2013 Oct;31(7):1378-85.

Masferrer E, Ferrándiz-Pulido C, Masferrer-Niubò M, Rodríguez- Rodríguez A, Gil I, Pont A, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in penile squamous cell carcinoma. J Urol. 2015 Feb;193(2):699–705.

May M, Brookman-May S, Burger M, Koch S, Otto W, Bründl J, et al. A switch from epithelial to mesenchymal properties correlates with lymphovascular invasion in squamous cell carcinoma of the penis. Pathol Res Pract. 2015 Sep;211(9):641-5.

Mentrikoski MJ, Stelow EB, Culp S, Frierson HF Jr, Cathro HP. Histologic and immunohistochemical assessment of penile carcinomas in a North American population. Am J Surg Pathol. 2014 Oct;38(10):1340-8.

icalizzi DS, Maheswaran S, Haber DA. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. Genes Dev. 2017 Sep 15;31(18):1827-1840.

Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsagué X, Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. J Clin Pathol. 2009 Oct;62(10):870-8.

Naumann CM, Alkatout I, Hamann MF, Al-Najar A, Hegele A, Korda JB, et al. Interobserver variation in grading and staging of squamous cell carcinoma of the penis in relation to the clinical outcome. BJU Int. 2009 Jun;103(12):1660-5.

O'Brien JS, Perera M, Manning T, Bozin M, Cabarkapa S, Chen E, Lawrentschuk N. Penile Cancer: Contemporary Lymph Node Management. J Urol. 2017 Jun;197(6):1387-1395.

Ornellas AA, Nóbrega BL, Wei Kin Chin E, Wisnescky A, da Silva PC, et al. Prognostic factors in invasive squamous cell carcinoma of the penis: analysis of 196 patients treated at the Brazilian National Cancer Institute. J Urol. 2008 Oct;180(4):1354-9.

Paiva GR, de Oliveira Araujo IB, Athanazio DA, et al. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. Int Urol Nephrol 2015;47:295-9.

Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. Eur Urol. 2018 Apr;73(4):560-569.

Paolillo M, Schinelli S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes. Int J Mol Sci. 2019 Oct 7;20(19):4947.

Pham MN, Deal AM, Ferguson JE 3rd, Wang Y, Smith AB, Nielsen ME, et al. Contemporary survival trends in penile cancer: Results from the National Cancer Database. Urol Oncol. 2017 Dec;35(12):674.e1-674.e9.

Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, Solsona E, Tana S, Van Der Poel H, et al. EAU penile cancer guidelines 2009. Eur Urol. 2010 Jun;57(6):1002-12.

Pradella D, Naro C, Sette C, Ghigna C. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression. Mol Cancer. 2017 Jan 30;16(1):8.

Rieken M, Djajadiningrat RS, Kluth LA, Favaretto RL, Xylinas E, Guimaraes GC, et al. Predictors of cancer-specific mortality after disease recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the penis. Eur Urol. 2014 Nov;66(5):811–4.

Sanchez DF, Canete S, Fernandez-Nestosa MJ, Lezcano C, Rodriguez I, Barreto J, et al. HPV and non-HPV-related subtypes of penile squamous cell carcinoma (SCC): morphological features and differential diagnosis according to the new WHO classification (2015). Semin Diagn Pathol. 2015;32(3):198–221.

Sharma P, Zargar H, Spiess PE. Surgical advances in inguinal lymph node dissection: optimizing treatment outcomes. Urol Clin North Am. 2016 Nov;43(4):457-468.

Stecca CE, Alt M, Jiang DM, Chung P, Crook JM, Kulkarni GS, Sridhar SS. Recent advances in the management of penile cancer: a contemporary review of the literature. Oncol Ther. 2021 Jun;9(1):21-39.

Takiar R, Kumar S. Pattern of reproductive cancers in India. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(2):599–603.

Tang V, Clarke L, Gall Z, Shanks JH, Nonaka D, Parr NJ, et al. Should centralized histopathological review in penile cancer be the global standard? BJU Int. 2014;114(3):340–3.

Thomas A, Vanthoor J, Vos G, Tsaur I, Albersen M; and in collaboration with the European Reference Network for rare urogenital diseases and complex conditions (eUROGEN). Risk factors and molecular characterization of penile cancer: impact on prognosis and potential targets for systemic therapy. Curr Opin Urol. 2020 Mar;30(2):202-207.

Thomas A, do Canto Alvim LM, Rainho CA, Juengel E, Blaheta RA, et al. Systemic treatment of penile squamous cell carcinoma-hurdles and hopes of preclinical models and clinical regimens: a narrative review. Transl Androl Urol. 2021 Oct;10(10):4085-4098.

Vale L, Fernandes B, Rodrigues V, Dinis P, Silva C, Antunes-Lopes T. Prognostic factors in penile cancer: should we avoid inguinal lymph node staging? Urol Int. 2021;105(9-10):799-803.

Vanthoor J, Vos G, Albersen M. Penile cancer: potential target for immunotherapy? World J Urol. 2021 May;39(5):1405-1411.

Velazquez EF, Ayala G, Liu H, Chaux A, Zanotti M, Torres J, et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. Am J Surg Pathol. 2008 Jul;32(7):974-9.

Vieira CB, Teixeira-Júnior A, Feitoza L, Pinho J, Calixto J, do Nascimento FSMS, et al. A cohort study among 402 patients with penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil with the highest worldwide incidence. BMC Res Notes. 2020 Sep 18;13(1):442.

Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al. EMT International Association (TEMTIA). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020 Jun;21(6):341-352.

Zequi Sde C, Guimarães 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. J Sex Med. 2012 Jul;9(7):1860-7.

Zhou J, Tao D, Xu Q, Gao Z, Tang D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Mar 1;8(3):3150-4.

Zhou X, Qi F, Zhou R, Wang S, Wang Y, Wang Y, et al. The role of perineural invasion in penile cancer: a meta-analysis and systematic review. Biosci Rep. 2018 Oct 31;38(5).

Zhou YWB. New insights of epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis. Acta Biochim Biophys Sin 2008;40(7):643–50.

Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, Dai B, Ye DW. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. BJU Int. 2007 Jul;100(1):204-8.

Anexo 1 - Documento de acordo interinstitucional A.C.Camargo Cancer Center- *Lee Moffitt Cancer Center*

A.C.Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

MATERIAL TRANSFER AGREEMENT

This Material Transfer Agreement (this "Agreement") entered into on June 1, 2018 (the "Effective Date") by and between H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Inc., a Florida non-profit corporation organized pursuant to Section 1004.43 of the Florida Statutes, located at 12902 Magnolia Drive, Tampa, Florida 33612 ("Moffitt") and Fundação Antonio Prudente (also known as AC Camargo Cancer Center) with offices at 211, Professor Antonio Prudente Street, São Paulo/SP , 01509-900, Brazil ("Institution"), and Moffitt and Institution are hereinafter each individually referred to as a "Party" and collectively as the "Parties."

WHEREAS, Moffitt is a National Cancer Institute designated comprehensive cancer center, a statewide research institute, and a national resource for basic science, clinical research, and interdisciplinary approaches to research and patient treatment;

WHEREAS, the Parties desire to collaborate on a Research Project (defined hereinafter) and share Materials (defined below).

NOW, THEREFORE, in consideration of the foregoing recitals, which are incorporated herein as covenants, and the mutual promises herein made and exchanged, and for other good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, the Institution and Moffitt agree as follows:

1. **DEFINITIONS**

1.1. The foregoing recitals are hereby incorporated herein by reference and acknowledged as true and correct. For the purposes of this Agreement, the following words and phrases shall have the following meanings:

a. "Affiliates" means, with respect to either Party, any other corporation or business entity that directly, or indirectly through one (1) or more intermediaries, controls, is controlled by or is under common control with such Party. For purposes of this definition, the term "control" and, with correlative meanings, the terms "controlled by" and "under common control with" means direct or indirect ownership of more than fifty percent (50%) of the securities or other ownership interests representing the equity voting stock or general partnership or membership interest of such entity or the power to direct or cause the direction of the management or policies of such entity, whether through the ownership of voting securities, by contract, or otherwise.

b. "Confidential Information" means any and all information provided by or which will be provided or disclosed (whether or not purposely) by the Providing Party (either Moffitt or Institution, as the case may be) to the Receiving Party (either Moffitt or Institution, as the case may be), including, but not limited to proprietary technologies, economic information, business or research strategies, trade secrets and material embodiments thereof, furnished by or on behalf of such party which would reasonable be considered to be proprietary or confidential, or that is marked "confidential" (or if provided in oral, visual or non-tangible form, made known at the time of disclosure to be confidential). Notwithstanding the foregoing, any Confidential Information provided to Receiving Party shall be considered confidential as long as a reasonable person would consider it confidential information or by its nature should reasonably be considered confidential.

Confidential Information may further include the Confidential Information of each Party's Affiliates.

c. "Institution Investigator" shall mean Dr. Giuliano Aita and Dr. Stênio de Cássio Zequi ("Institution Investigators"), who will supervise the Research Project under this Agreement on behalf of Institution.

d. "Invention" means any inventions, developments, discoveries, and improvements, whether or not patentable, that arises from the Research Project.

e. "Investigators" shall collectively refer to the Institution Investigator and the Moffitt Investigator.

f. "Materials" shall collectively refer to the Institution Material and the Moffitt Material described in Exhibit A.

g. "Data" shall mean Data described in Exhibit A.

h. "Moffitt Investigator" shall mean Dr. Philippe E. Spiess who will supervise the Research Project under this Agreement on behalf of Moffitt.

i. "Providing Party" means the Party furnishing the Materials or Confidential Information under the Research Project.

j. "Receiving Party" means the Party receiving the Materials or Confidential Information under the Research Project.

k. "Representatives" means, with respect to a Party, (a) its employees, contractors, subcontractors, consultants, agents, Affiliates or persons otherwise associated with such Party as a result of the performance of this Agreement and (b) the employees, contractors, subcontractors, consultants, agents of such Party's Affiliates or persons otherwise associated with such Party's Affiliates as a result of the performance of this Agreement.

l. "Research Project" means the research described in Exhibit A, which is incorporated herein in its entirety. The Research Project may only be changed or amended by prior written agreement by the Parties.

m. "Research Results" means all data and information, which are generated in the performance of the Research Project during the term of this Agreement.

n. "Third Party" means any party other than Moffitt, the Institution or their respective Affiliates.

2. TRANSFER AND USE OF MATERIALS

2.1. Delivery of Moffitt Material. Moffitt shall deliver to the Institution the Moffitt Material by a mutually agreed upon date. Such delivery may occur in multiple installments while this Agreement is in full force and effect. Moffitt owns all rights, title, and interest in the Moffitt Material.

2.2. Delivery of Institution Material. Institution shall deliver to Moffitt the Institution Material by mutually agreed upon date. Such delivery may occur in multiple installments while this Agreement is i full force and effect. Institution owns all rights, title, and interest in the Institution Material.

2.3. Inadvertent Transfer of PHI. In the event Protected Health Information (PHI), as defined b HIPAA, as amended, is inadvertently disclosed to the Receiving Party from the Providing Party i connection with this Agreement, the Receiving Party will immediately notify the Providing Party and wi return or destroy such PHI, in accordance with the Providing Party's instructions. Pending return c destruction of any PHI, the Receiving Party shall maintain the confidentiality of all data (including th PHI) and use appropriate safeguards to prevent access to, use, or disclosure of data (including the PHI).

2.4. Compliance with Laws. Each Party shall comply with all laws, statutes, regulations and guideline applicable to that Party and the conduct of the Research Project, including, but not limited to the federa Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996 (HIPAA) and the Health Informatio Technology for Economic and Clinical Health Act (HITECH) and their implementing regulations, an seek appropriate Institutional Review Board, Ethics Committee, or other similar board review, whe applicable, in performing its obligations under this Agreement.

2.5. Handling, Storage, and Transportation of the Materials. Both Parties acknowledge that th Materials are experimental in nature and may have unknown characteristics. Each Party therefore agree to use prudence and all reasonable care in the use, handling, storage, transportation and disposition an containment of the Materials, and to maintain them under suitable containment conditions in compliance with all applicable national, state and local laws, regulations, rules and ordinances.

2.6. Animal Related Terms and Conditions. If animals are being transferred under this Agreemen each Party further agrees to comply with the following animal-related terms and conditions:

a. In accepting these animals, each Party accepts full responsibility for their custody, care and us under all applicable Federal laws, including but not limited to the Animal Welfare Act an implementing U.S.D.A. regulations. The Providing Party grants no right, title or interest in an patented or patentable subject matter contained within the animals.
b. Each Party agrees that it will comply with the Animal Welfare Act and its implementin regulations, as applicable. Each Party agrees that it will adhere to acceptable standards fo humane care and use of the animal(s), and assures the other Party that it has appropriate anima care and use policies in place. The "Public Health Service Policy on Humane Care and Use o Laboratory Animals" and "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" are examples o acceptable standards for humane care and use of research animals.

c. Each Party agrees that it will adhere to appropriate biosafety practices and use the animals in safe and responsible manner. The National Institutes of Health/Centers for Disease Contro publication "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" is an example o acceptable standards for biosafety practices. Each Party agrees that it will comply with al applicable import/export regulations.

d. Each Party shall maintain a current Animal Welfare Assurance with the Office of Laborator Animal Welfare (OLAW) and the National Institutes of Health (NIH).

e. Each Party's facilities which is utilized to house animal subjects will provide adequate veterinary care for animal subjects in accordance with the Animal Welfare Act, the regulations promulgated under the Animal Welfare Act, Title 9 Code of Federal Regulations Part 2, Subpart C, §2.33.

f. Each Party is responsible for providing veterinary oversight and support for animal subjects housed or used at its respective facilities.

g. Each Party's IACUC will review all research related to the Research Project conducted at its facility, and provide the other Party, upon request, with a copy of the regulatory file including the approved protocol, any and all related correspondence, as well as any approved modifications to the protocol.

h. Each Party will provide copies of their latest semiannual inspection reports pertaining to housing and procedure areas specific to the Research Project to the other Party if any issues and concerns are identified.

i. Each Party is responsible for notifying the other Party of any instance of noncompliance with respect to the care or treatment of animal subjects that are involved in research pertaining to the Research Project.

3. ANALYSIS AND USE OF MATERIALS

3.1. Analysis of Materials. Both Parties agree that the Materials:

a. are to be used solely for the Research Project;

b. shall not be used in human subjects, in clinical trials, or for diagnostic purposes involving human subjects; and,

c. are to be used only in the each Investigator's laboratory, respectively, under the direction of each Party's Investigator or others working under their direct supervision.

d. shall be in compliance with all applicable laws and regulations, including those of HIPAA, NIH, FDA, and/or DHHS Federal Code of Regulations for the protection of human subjects (45 CFR 46).

4. CONFIDENTIALITY

4.1. Generally. Except as expressly set forth in Section 6, Receiving Party shall not publish or disclose to Third Parties any of the Providing Party's Confidential Information.

4.2. Exceptions. Any information disclosed by the Providing Party to the Receiving Party will not be deemed Confidential Information to the extent that such information:

a. At the time of disclosure is in the public domain, other than as a result of a breach of an obligation of confidentiality or non-use or other misappropriation; or

b. Becomes part of the public domain, by publication or otherwise, other than as a result of a breach of an obligation of confidentiality or non-use or other misappropriation; or

c. At the time of disclosure is already in possession of the Receiving Party, without restriction as to confidentiality or use, as established by contemporaneous written records; or

d. Is lawfully provided to the Receiving Party, without restriction as to confidentiality or use, by a Third Party lawfully entitled to possess and make unrestricted disclosures of such information; or

e. Is independently developed by the Receiving Party without use of or reference to the Providing Party's Confidential Information, as established by contemporaneous written records.

4.3. Government Required Disclosure. If a duly constituted government authority, court or regulatory agency orders that the Receiving Party disclose information subject to an obligation of confidentiality under this Agreement, the Receiving Party shall comply with the order, but shall (a) give prompt written notice to the Providing Party of the proposed disclosure, and allow the Providing Party at least thirty (30) days to object to all or any portion of the disclosure before it is disclosed; (b) if advance notice is not possible, provide written notice of disclosure immediately thereafter; (c) to the extent possible, minimize the extent of such disclosure; and (d) secure confidential treatment of such information prior to its disclosure (whether through protective orders or otherwise), it being understood that any information so disclosed shall otherwise remain subject to the limitations on use and disclosure hereunder. The Receiving Party shall take into consideration all comments and objections raised by the Providing Party regarding the disclosure of any of the Providing Party's Confidential Information. The Receiving Party shall further cooperate and provide the Providing Party with the opportunity to seek any protective order reasonably deemed necessary by the Providing Party.

4.4. Disclosure and Use Restriction. The Receiving Party agrees to keep confidential all Confidential Information it receives from the Providing Party and not to disclose, transfer or use the Confidential Information for any purpose other than as expressly permitted under this Agreement. The Receiving Party will not use the Confidential Information of the Providing Party for any purpose other than the performance of its obligations and exercise of its rights under this Agreement.

4.5. Return of Confidential Information. The Receiving Party agrees to return or destroy promptly (and certify such destruction) at Providing Party's request all Confidential Information of the Providing Party. If not earlier requested, upon termination of this Agreement, the Receiving Party shall promptly return to the Providing Party such Confidential Information, and shall destroy all copies thereof, together with all notes, drawings, abstracts and other information relating to the Providing Party's Confidential Information prepared by the Receiving Party or any of its Representatives, regardless of the medium in which such information is stored; provided, however, that the Receiving Party may maintain one (1) archival copy of the Providing Party's Confidential Information, which such archival copy shall remain subject to the obligations of confidentiality and non-use set forth herein. The return or destruction of the Confidential Information as provided above shall not relieve the Receiving Party of its other obligations under this Section 4.

4.6. Security and Use. The Receiving Party agrees to (i) institute and maintain reasonable and customary security procedures to identify, protect and account for all copies of Providing Party's

Confidential Information, and (ii) limit disclosure of Providing Party's Confidential Information to its Representatives having a need to know such Confidential Information for purposes of the Receiving Party exercising its rights and performing its obligations under this Agreement; provided that such Representatives are informed of the confidential nature of the information and the terms of this Agreement with respect thereto, and are subject to obligations of confidentiality, non-disclosure, non-use and inventions similar to and at least as restrictive as those set forth in this Agreement. The Receiving Party shall notify Providing Party as promptly as practicable of any unauthorized use or disclosure of the Confidential Information; provided, that, for clarity, such notification shall not excuse the Receiving Party from any liability in connection with such unauthorized use or disclosure.

4.7. Continuing Obligations. Notwithstanding any other provision herein to the contrary, the obligation of confidentiality shall remain in effect for five (5) years measured from the Effective Date.

4.8. Publicity. Neither Party will refer to, display or use the other's name, trademarks or trade names confusingly similar thereto, alone or in conjunction with any other words or names, in any manner or connection whatsoever including any form of advertising or publicity, except with the prior written consent of the other Party. Neither Party shall disclose to any Third Party nor to the public generally (a) the terms of this Agreement, or (b) the specific relationship between the Parties established hereunder.

5. INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

5.1. Background Intellectual Property. It is recognized and understood that the Parties are engaged in proprietary research and development activities. Both Parties have rights to their own separate intellectual property, and may further have materials and technologies that are the subject of various pending patent applications, which are not affected by this Agreement or by any amendment to this Agreement. This Agreement in no way confers any license under any patent or proprietary interests of one Party to the other.

5.2. U.S. Patent Law. Inventorship shall be determined in accordance with United States patent laws and initial ownership shall follow inventorship.

5.3. Invention Disclosure. The Parties agree to disclose to each other, in writing, each and every Invention. The Parties acknowledge that they will disclose an Invention to each other within one (1) month after the Invention was reported in writing to the person(s) responsible for patent matters of the disclosing Party.

5.4. Assignment. Each Party shall have separate agreements with their employees whereby the employees are obligated to assign all right, title, and interest in any Invention to their employers.

5.5. Use of Research Results. Both Parties may use the Research Results in accordance with applicable laws and subject to Section 6 of this Agreement.

6. PUBLICATION

6.1. Joint Publication. The Parties intend that the results of the Research Project shall be published in scientific peer reviewed journals. Moffitt and Company shall collaborate together in writing the first

manuscript related to the Research Project that will be submitted for publication to a respected scientific journal.

6.2. Authorship. Authorship shall be based on contributions to the Research Project, in accordance with academic standards and custom.

6.3. Consent of Publication. Neither Party shall independently publish the first manuscript in a respected scientific journal related to the Research Project without the consent of the other Party, provided, however, if a coordinated publication has not occurred one year after the conclusion or termination of the Research Project, then the Parties shall be free to publish their individual results independently.

6.4. Presentations. Either Party shall be permitted to give a presentation concerning results of the Research Project, provided that the presenting Party furnishes the other Party the presentation slides thirty (30) days before the presentation to allow the reviewing Party to remove Confidential Information provided by such Party, and agrees to delay publication for an additional sixty (60) days if the other Party determines that the proposed publication contains patentable subject matter which requires protection.

7. REPORTS

7.1. Reporting Requirements. The Parties shall communicate with each other regularly concerning the Research Project and each Party shall provide the other Party a summary of Research Results every six (6) months from the Effective Date or as otherwise agreed to by the Parties.

7.2. Final Report. At the conclusion of the Research Project, the termination of this Agreement, or the expiration of this Agreement, whichever occurs first, each Party shall furnish the other Party with a summary of Research Results obtained by it in the performance of the Research Project. Each Party shall be free to use the Research Results of the Research Project for its own internal research, education, clinical and publication purposes without the payment of royalties or other fees.

8. WARRANTY DISCLAIMER, INDEMNIFICATION AND LIABILITY

8.1. Disclaimer. EXCEPT AS OTHERWISE EXPRESSLY PROVIDED HEREIN, CONFIDENTIAL INFORMATION AND MATERIALS TRANSFERRED FROM ONE PARTY TO THE OTHER IN THE COURSE OF THE RESEARCH PROJECT ARE SUPPLIED "AS IS" WITHOUT ANY WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY, TITLE, NON-INFRINGEMENT OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. HOWEVER, UPON THE EFFECTIVE DATE HEREOF, NEITHER PARTY HAS ANY KNOWLEDGE OF SUCH INFRINGEMENT.

8.2. Indemnification. Neither Party shall have any obligation to indemnify the other, and/or its agents, employees and representatives.

8.3. Liability. The Parties agree to each be solely responsible for all acts or omissions in the performance of their duties hereunder to the extent permitted by applicable law, and shall be financially and legally responsible for all liabilities, costs, damages, expenses and attorney fees resulting from, or attributable to any and all such acts or omissions, to the extent permitted by applicable law.

9. COMMUNICATION AND NOTICE

9.1. Communication and Notice. Any notice or other communication required or permitted under this Agreement shall be in writing, shall specifically refer to this Agreement, and shall be deemed effective upon receipt. Any notice or communication shall be sent by one of the following methods: (a) delivered by hand; (b) registered or certified mail with postage prepaid and return receipt requested; or (c) recognized national courier service. The notice or communication shall be sent to the following address:

MOFFITT:
H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Inc.
Attention: Sr. Director, Innovation and Industry Alliances
12902 Magnolia Drive, Mailstop: M2Gen-INNOV
Tampa, Florida 33612-9497

WITH COPIES TO:
H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Inc.
Attention: General Counsel
12902 Magnolia Drive, Mailstop: SRB-OGC
Tampa, Florida 33612-9497

INSTITUTION:
AC Camargo Cancer Center
For Institution:
AC Camargo Cancer Center-CIPE (Centro Internacional de Pesquisa)
Attention: Research Superintendent –Vilma Regina Martins
R. Pirapitingui, 204 - Liberdade, São Paulo - SP, 01508-010

Attention:
Urology Division/Pelvic Department Surgery
Dr. Stênio de Cássio Zequi MD, PhD
Rua Professor Antônio Prudente,211
CEP:01509-010 São Paulo-SP- Brazil

10. TERM AND TERMINATION

10.1. Term and Termination. This Agreement shall terminate upon completion of the Research Project or two (2) years from the Effective Date, whichever occurs first. Either Party may terminate this Agreement on ten (10) days written notice should any human subject from whom Materials was collected object to the use set forth herein, or should an Institutional Review Board or other comparable body object to the terms of this Agreement or the provision or use of the Materials.

10.2. Termination for Breach. In the event that either Party commits a breach in any of the terms or conditions of this Agreement and that Party fails to remedy that default or breach within thirty (30) days after receipt of written notice of that breach from the other Party, the Party giving notice may, at its option and in addition to any other remedies it may have in law or in equity, terminate this Agreement by sending written notice of termination to stop the work as soon as it is practicable to do so.

10.3. Return of Materials. Upon termination or expiration of this Agreement, whichever occurs first, the rights granted to both Parties to use the Materials shall terminate immediately, and each Party shall immediately return or destroy any remaining Materials to the other Party, and such determination shall be made in each Party's sole discretion.

10.4. No Release Upon Termination. Upon termination or expiration of this Agreement, nothing herein shall be construed as a release of either Party from any obligation that matured prior to the termination or expiration of this Agreement.

10.5. Survival. The provisions of this Agreement that by their nature should survive the termination or expiration of this Agreement, including Sections 4, 5, 6, 7, 8, 11, and Section 12 of this Agreement, together with any appendices referenced therein.

11. MISCELLANEOUS

11.1. Export Control Laws. Each Party shall comply with all applicable United States law and regulations controlling the export of certain commodities and technical data, including without limitation all Export Administration Regulations of the United States Department of Commerce. Among other things, these laws and regulations prohibit or require a license for the export of certain types of commodities and technical data to specified countries. Each Party hereby gives written assurance that it shall comply with all applicable United States export control laws and regulations, that it bears sole responsibility for any violation of such laws and regulations by itself.

11.2. Independent Contractors. Each of the Parties is an independent contractor and nothing herein contained shall be deemed to constitute the relationship of partners, joint venturers, nor of principal and agent between the Parties. Neither Party shall at any time enter into, incur, or hold itself out to Third Parties as having authority to enter into or incur, on behalf of the other Party, any commitment, expense, or liability whatsoever.

11.3. Compliance with Laws. Both Parties shall comply with all applicable laws, rules and regulations, including without limitation HIPAA, and the regulations promulgated there under governing the privacy and security of health information.

11.4. No Assignment of Rights. Neither Party shall not assign or transfer any rights, obligations or duties under this Agreement without the prior written consent of the other Party.

11.5. Entire Agreement, Amendments. This Agreement shall constitute the entire understanding between the Parties and supersedes any and all prior or contemporaneous representations, agreements and promises, written or oral, between the Parties regarding the subject matter of this Agreement. No modification, amendment, or waiver may be accomplished to the terms of the Agreement without the written consent of both Parties.

11.6. Severability. In the event that any provision of this Agreement shall be found invalid, illegal or unenforceable, the validity, legality and enforceability of the remaining provisions shall not in any way be affected or impaired.

11.7. Rights of U.S. Government. It is understood that this Agreement in no way alters any rights that the U.S. Government might have.

11.8. Governing Law. This Agreement shall be governed by, and construed and interpreted in accordance with, the laws of the State of Florida without reference to conflict of laws principles or statutory rules of arbitration included therein. Any dispute or proceeding under this Agreement shall be subject to the exclusive jurisdiction and venue of the 13th Judicial Circuit in and for Hillsborough County, Florida and the Parties hereby consent to the exclusive personal jurisdiction and venue of these courts.

11.9. Headings and Subtitles. The headings preceding the text of each section of this Agreement are for convenience only and shall not be construed to define, modify, expand, limit, or affect the construction of or to be taken into account in interpreting the substance of this Agreement.

11.10. Electronic Signature. The Parties agree that this Agreement may be executed and delivered by facsimile, electronic mail, internet, or any other suitable electronic means, and the Parties agree that signatures delivered by any of the aforementioned means shall be deemed to be original, valid, and binding upon the Parties.

IN WITNESS WHEREOF, the Parties have duly executed this Agreement on the Effective Date set forth above.

H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE, INC.

Digitally signed by Margaret J. Fonner, CRA
Date: 2018.07.12 12:35:14 -04'00'

Margaret J. Fonner, CRA

By: ~~Director, Office of Sponsored Research~~

FOR: Name: James J. Mulé, PhD

Title: Associate Center Director, Translational Science

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

A. C. CAMARGO CANCER CENTER
DRA. VILMA REGINA MARTINS
Superintendente de Pesquisa
Chefe do Grupo de Biologia Celular e Molecular

By: _____

Name: Vilma Regina Martins

Title: Research Superintendent

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

A. C. CAMARGO CANCER CENTER
Dr. Giovanni Rosso
Gerente de Negócios em Pesquisa

By: _____

Name:

Title:

EXHIBIT A

Title:
Vimentin and E-cadherin immunohistochemical profile in penile cancer patients who have undergone c not to inguinal lymphadenectomy, without metastases. International collaboration study.

Materials:
261 Penile tumor tissue samples from AC Camargo Cancer Center patients. And samples of penile cance patients (without lymph nodal involvement) from Lee Moffitt Cancer Center will be studied also. If i future, other center will collaborate, a new MTA or an addendum to this document must be arranged

Study Purpose:
Primary objective: to evaluate expression of the vimentin and E-cadherin (mesenchymal epitheli transition markers) in pathologic specimens of penile carcinoma via immunohistochemistry.

Secondary objectives: - to evaluate the association between vimentin and E-cadherin (E-CAD) expressio X recurrence and overall survival in penile carcinoma patients;
- to evaluate the associations between these biomarkers and multiple demographic, clinic and pathologic variables.

Research Project:
Our data bank consists of 261 patients surgically treated for penile cancer between 1953 an 2012 in which immunohistochemical analysis will be done. We will add to the data bank cases of penil cancer with clinically negative lymph nodes followed for three or more years without relapses an patients with clinical and or histological negatives lymph nodes from Moffitt Cancer Center. After thi the prognostic value of vimentin and E-cadherin will be analyzed.

The sections of the respective primary tumors will be mounted on positively charged glas slides, dried for 30 min at 37^{0}C, deparaffinized in xylene, and rehydrated in a series of graded alcohol The sections will be then incubated with primary mouse monoclonal antibody against vimentin (mous monoclonal V9 DAKO, USA) at 1:200 for 60 minutes and E-CAD (mouse monoclonal NCH-38, DAK CA) at 1:100. A positive control will be used in all reactions in tissues that were known to be reactive fo vimentin/E-CAD. Negative controls—without primary antibody and substituting the antibody wit nonimmune serum—will be also performed. Immunohistochemical reactions will be analyzed on Scanscope XT scanner system (Aperio Technologies, Inc, CA). The tumor samples will be analyzed in areas of the tumor—the tumor core (CC) and the deepest infiltrative edge, termed the invasion front (IF) Patients with more than 90% of cells expressing E-CAD will be classified as the positive expressio group. To analyze the expression of vimentin, we considered the cytoplasmic expression patterns in tumo cells at the IF. Cases with more than 10% of cells expressing vimentin will be considered as positive. Ou group used this methodology in a recent study (da Cunha IW et al. Epithelial-mesenchymal transitio (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncologic outcomes. **Urol Oncol**. 2016 Oct; 34(10):433.e19-26). A combined analysis will be performed using bot E-CAD and vimentin to determine EMT status: 1) EMT absent (E-CAD positive and vimentin negative) 2) partial EMT (E-CAD- and vimentin- negative expression), and 3) complete EMT (E-CAD negativ and vimentin positive). The immunohistochemical reactions and analyses will be hold at Lee Moffi

Cancer Center (on behalf of Its Urology and Pathology departaments- Suppervisioned BY dr. Philippe S Spiess).

Data:
Institution will provide analysis of associations with clinical outcomes such as stage, histological grade, lymph node status, lymphovascular invasion, metastasis, recurrence, and overall survival to AC Camargo Cancer Center, and vice-versa.

Anexo 2 - Carta convite e certificado do *Academic Visitor and Scholar Program*

May 29, 2019

Re: Academic Visitor & Scholar Program – Aita Giuliano

To Whom It May Concern:

This letter serves as verification of and approval that Aita Giuliano invited as a participant in the Academic Visitor & Scholar Program at the H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute from **July 1, 2019 to July 12, 2019** within the GU Oncology Program at the Moffitt Cancer Center in Tampa, Florida under the tutelage of Dr. Philippe Spiess.

Orientation is scheduled for ***July 1st at 10:00 am*** with Sarai Velez, in the main lobby at the Moffitt Cancer Center. If you have any questions, please do not hesitate to contact me directly.

Sincerely,

Sarai Velez
Coordinator
Academic Visitor & Scholar Program
H. Lee Moffitt Cancer Center & Research
Institute Office: 813/745-1259
Fax: 813/449-8545
Email: avsp@moffitt.org

cc: Philippe Spiess, MD
Rachel Compitello

CERTIFICATE OF ATTENDANCE
GENITOURINARY ONCOLOGY PROGRAM

is presented to

Giuliano Amorim Aita

ACADEMIC VISITOR & SCHOLAR PROGRAM
H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute
Tampa, Florida, U.S.A.

July 1, 2019 to July 12, 2019

MOFFITT CANCER CENTER

A National Cancer Institute
Comprehensive Cancer Center

Philippe E. Spiess, M.D., MS, FRCS(C), FACS
Senior Member, Department of GU Oncology
Senior Member, Department of Tumor Biology
Assistant Chief of Surgical Services
Moffitt Cancer Center
Professor, Department of Urology
University of South Florida

Anexo 3 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE - A.C. CAMARGO CANCER CENTER

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil imunohistoquímico da vimentina e da E-caderina em portadores de câncer de pênis submetidos ou não a linfadenectomia inguinal, sem metástases linfonodais. Estudo colaborativo internacional.

Pesquisador: Stênio de Cássio Zequi

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 4

CAAE: 72112517.0.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.958.839

Apresentação do Projeto:

O carcinoma escamoso do pênis (CEP) consiste em uma neoplasia localmente agressiva cujo tratamento afeta negativamente a qualidade de vida e a auto-estima dos pacientes. A presença e a extensão do envolvimento dos linfonodos inguinais são os fatores prognósticos mais importantes. O tratamento das metástases linfonodais é a linfadenectomia inguinal bilateral - um procedimento complexo que está associado a alta morbidade. A maioria dos estudos disponíveis na literatura é concentrada em pacientes com linfonodos comprometidos pelo tumor (pN+), enquanto poucos estudos examinaram pacientes com linfonodos histologicamente negativos (pN0). Embora os pacientes com pN0 apresentam melhor prognóstico quando comparados àqueles com linfonodos positivos, a ausência de metástase linfonodal não garante a cura da doença. Alguns desses pacientes irão experimentar recorrência loco-regional ou progressão tumoral. A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo que permite que uma célula epitelial sofra alterações bioquímicas, moleculares e morfológicas que levam à aquisição de um fenótipo de células mesenquimais com aumento do potencial de migração, maior capacidade de invasão de tecidos e maior resistência à apoptose. Várias classes de marcadores epiteliais ou mesenquimais têm sido usados para determinar a presença de TEM, como as proteínas de superfície (E-caderina) e marcadores do citoesqueleto (vimentina e -catenina). O objetivo do estudo é analisar o papel prognóstico da expressão da E-caderina e da vimentina na sobrevida global (SG), sobrevida câncer

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

específica (SCE) e sobrevida livre de doença (SLD) no período de 10 anos em pacientes com CEP e linfonodos negativos. A perda da E-caderina e o aumento da expressão imuno-histoquímica da vimentina estão associados a piores desfechos nos pacientes com câncer de pênis (menor sobrevida livre de doença, menor sobrevida câncer específica e menor sobrevida global).

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina e vimentina nos pacientes submetidos a LI e com LNFDs histologicamente negativos (grupo pN0) e nos pacientes com LNFDs clinicamente negativos não operados e seguidos por 3 ou mais anos (grupo cN0);
- Correlacionar os achados descritos acima com os dados demográficos e clinicopatológicos;
- Avaliar o impacto da expressão imuno-histoquímica das proteínas E-caderina e vimentina como fatores prognósticos nas taxas de SG, SCEe SLD.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os potenciais riscos do estudo são a perda de confidencialidade dos prontuários e da possibilidade, mesmo que remota, de ocorrer extravio de material, como os blocos de parafina.

Benefícios:

A identificação e a validação de novos marcadores tumorais no CEP poderá auxiliar nas decisões terapêuticas destes pacientes, sugerindo quais poderão ser poupados das dissecções linfonodais regionais, evitando assim a morbidade associada a este procedimento. Além disso, tal achado poderá ajudar a selecionar os pacientes que poderão ser beneficiados por alguma espécie de tratamento adjuvante. Estes estudos devem preferencialmente ser conduzidos através de cooperação multicêntrica para a obtenção de amostra populacional adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta seleção permitiu a obtenção de um total de 261 pacientes, aonde serão somados a estes casos, o material proveniente do Lee Moffitt Cancer Center, de Tampa, FI, EUA (estimativa de 100 casos , que ainda não está em posse dos pesquisadores responsáveis no Brasil. Este material tem programação para ser analisado no centro de origem nos Estados Unidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As observações feitas pela CONEP foram respondidas adequadamente pelo pesquisador responsável. A CONEP menciona que o CEP do ACCamargo decide pelo julgamento das pendências

levantadas anteriormente, pois os apontamentos não são da alçada da CONEP, visto que o pesquisador responsável pertence a esta instituição e que o projeto será financiado pela próprio pesquisador, que participou de um Projeto Temático (n. 2009/52088-3) em câncer de pênis, financiado pela FAPESP (fonte financiadora dos projetos afiliados ao Temático).

Por tratar-se de estudo retrospectivo, com levantamento de dados junto aos prontuários, os pesquisadores solicitaram a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, comprometendo-se a preservar a privacidade dos participantes da pesquisa.

Foi apresentado um termo de acordo mútuo entre o A.C.Camargo Cancer Center e o Lee Moffitt Cancer Center, que normatiza a transferência de material entre as duas instituições, para a realização desta pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este comitê acatou as respostas para as recomendações da CONEPE e as considerou adequadas.

Sugerimos utilizar a descrição específica da palavra expressão PROTEICA de e-caderina e vicentina. Além de alteração ortográfica da palavra imuno-histoquímica.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	resposta_recomendacao_conep.pdf	10/09/2018 09:55:01	Sandra Fabiana de Almeida	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_917530.pdf	06/09/2018 15:31:29		Aceito
Outros	centros_participantes.pdf	06/09/2018 15:31:10	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	06/09/2018 15:30:35	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	06/09/2018 15:30:25	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGiuliano.docx	06/09/2018 15:06:21	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Outros	FormsubmissaoCEP.pdf	06/09/2018 15:04:15	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Outros	identificacaocurriculos.pdf	06/09/2018 15:02:52	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Doccienciauro.pdf	06/09/2018 15:02:12	Stênio de Cássio Zequi	Aceito

Declaração de Instituição e Infraestrutura	DocciencíaPat.pdf	06/09/2018 15:01:41	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termocompromisso.pdf	06/09/2018 15:01:04	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termodispensaconsentimento.pdf	06/09/2018 15:00:43	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaodadoscoletados.pdf	06/09/2018 15:00:09	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinfraestrutura.pdf	06/09/2018 14:59:36	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Outros	termodeacordo.pdf	06/09/2018 13:24:21	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Cronograma	Cronogramadetalhado.docx	06/09/2018 13:23:12	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Parecer_biobanco_.pdf	19/11/2017 23:44:56	Stênio de Cássio Zequi	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 11 de Outubro de 2018

Assinado por:
Jefferson Luiz Gross
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br