

CARCINOMA OF THE PENIS: THE VALUE OF PROLIFERATING CELLULAR NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)

ANTONIO CARLOS PEREIRA MARTINS, SANDRO MENDONÇA DE FARIA,
MARIA ANGELES LLORACH VELLUDO, ADAUTO JOSÉ COLOGNA,
HAYLTON JORGE SUAID, SILVIO TUCCI JR.

Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP
(FMRP-USP), SP

ABSTRACT

Objectives: To compare the proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) immunoeexpression with biological aggressiveness (stage and grade) of squamous cell carcinoma of the penis.

Material and Methods: Between 1976-95, 50 patients with squamous cell carcinoma of the penis underwent surgical penile amputation (total or partial). Fifteen of them required associated inguinal lymphadenectomy due to suspicion of lymph node metastasis. The material kept into formalin or paraffin was recovered to study the immunoeexpression of PCNA by the avidin-biotin-peroxidase method. Metastases occurred in 4 of 34 well-differentiated tumors, in 4 of 12 moderately differentiated and in 2 of 4 undifferentiated tumors.

Results: A diffuse and strong pattern of staining (D+++) was found in 18/34 well-differentiated, in 10/12 moderately differentiated and in 4/4 undifferentiated tumors. All tumors with metastasis were D+++ , including 4/18 well-differentiated and 4/10 moderately differentiated tumors exhibiting such pattern of staining.

Conclusion: There is a strong positive relation between pattern D+++ of PCNA staining and tumor staging ($p = 0.003$), but not with grading ($p = 0.06$). The authors conclude that PCNA seems an independent marker and suggest that hosts with tumors bearing PCNA pattern of staining other than D+++ may be sparing from lymphadenectomy, while those with D+++ tumor should be submitted to lymphadenectomy and/or kept under strict observation.

Key words: penis, carcinoma, squamous cell carcinoma of penis, PCNA, prognosis

Braz J Urol, 26: 38-42, 2000

INTRODUÇÃO

É comum a heterogeneidade celular e, mesmo um tumor considerado homogêneo e de baixo grau pode conter um ou mais clones celulares indiferenciados. Há subjetividade na graduação histológica e a identificação desses clones nem sempre é percebida na análise patológica convencional. Daí o interesse de se investigar as neoplasias através de técnicas modernas de biologia molecular.

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma molécula de 36 kDa que funciona como co-fator da DNA-polimerase (1). Ela está presente em todas as fases do ciclo celular, mas sua síntese é maior na fase S além de também estar associa-

da ao reparo do DNA (2). Sua identificação por imunohistoquímica indica que a célula está em processo ativo de divisão celular ou em processo de reparo do DNA (3,4). Pelo fato da imunohistoquímica ser uma técnica de baixo custo e de fácil execução, com potencial de uso prático rotineiro, há trabalhos procurando relacionar a imunoeexpressão do PCNA com o grau, bem como com o comportamento biológico de diversos tumores: carcinoma epidermóide de esôfago (5), câncer pulmonar (6), carcinoma de células transicionais da bexiga (7), hipernefroma (8), câncer de mama (9).

O carcinoma do pênis é mais comum em países pobres e nas regiões mais desenvolvidas de nosso país a incidência vem declinando (10). O método

de manejo desses tumores é controvertido porque a agressividade biológica é variável não podendo ser caracterizada com precisão pelas técnicas clássicas de gradação histológica (11-13).

O objetivo deste trabalho é estudar a imunexpressão do PCNA em carcinoma epidermóide de pênis procurando verificar se existe correlação com o grau e o estágio, bem como observar se é possível definir um novo parâmetro que reflita a agressividade biológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre 1976 e 1995, foram tratados no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, SP, com penectomia parcial ou total, 50 pacientes com carcinoma epidermóide de pênis. No momento do diagnóstico a idade deles variou de 32 a 80 anos, com média de 58,2 anos. Todos receberam alta em boas condições, mas 9 não retornaram para seguimento. Nos 41 restantes o tempo de acompanhamento variou de 6 meses a 7 anos. Em 15 pacientes com suspeita de metástases linfonodais fez-se linfadenectomia inguinal bilateral (linfonodos superficiais e profundos). O exame histológico confirmou metástases linfonodais em 10 deles, dos quais 4 eram do grupo dos 9 pacientes que não retornaram para seguimento.

Como complementação diagnóstica do estadiamento, além da palpação inguinal e da linfadenectomia dos casos suspeitos, empregou-se no atendimento inicial e durante o seguimento, o RX de tórax e a ultra-sonografia abdominal. A tomografia computadorizada de região inguinal e abdome foi empregada nos 15 pacientes com suspeita de metástases inguinais. O mapeamento ósseo com tecnécio radioativo foi indicado em 1 paciente com dores ósseas e suspeito de portar metástase em coluna lombar. Dos 10 casos com metástases ganglionares inguinais, 3 desenvolveram também metástases à distância (pulmão – 2, coluna – 1).

As peças cirúrgicas conservadas em formol tamponado a 10%, os blocos de parafina e respectivas lâminas foram identificados e recuperados do arquivo do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Após revisão das lâminas, cortes adicionais para co-

loração em hematoxilina-eosina foram efetuados para exame histológico, de modo que em cada caso selecionou-se cuidadosamente a porção tumoral que seria estudada. Para o estudo do PCNA empregou-se o método convencional de desparafinação com xilol seguido de hidratação com álcool etílico, assim como recuperação antigênica (14). Cortes de 4 micra foram então processados para detecção imunohistoquímica do PCNA pelo método da avidina-biotina-peroxidase conforme proposição de HSU et al. (15). Empregou-se o anticorpo primário monoclonal anti-PCNA, PC-10, DAKO®, na diluição 1:60, e o anticorpo secundário produzido em coelho contra camundongo (Kit ABC Vector®, pK 4002). A revelação da reação foi realizada com substrato cromogênico DAB- Sigma®, código N.º D 5637. Adotou-se análise semiquantitativa para a leitura das lâminas tanto no padrão de marcação difusa (D) quanto focal (F), conforme o critério seguinte: material não corado (-), levemente positivo - área com até 25% de marcação (+), moderadamente positivo - 25 a 50% da área corada (++) e fortemente positivo - >50% da área corada (+++).

Para a análise estatística empregou-se o teste exato de Fischer.

RESULTADOS

Na Tabela-1 estão os resultados da imunexpressão do PCNA conforme a gradação histológica dos tumores; o coeficiente Phi das 3 proporções D+++ versus diferenciação celular dos tumores é 0,34 e o valor $p = 0,06$.

Pela Tabela-2 observa-se que a associação entre as proporções do padrão D+++ em 10 pacientes com metástases é diferente daquela encontrada nos 40 pacientes sem metástases ($p = 0,006$ e coeficiente Phi = 0,37). A correlação entre o padrão de marcação D+++ e o estágio local (T) revelou coeficiente Phi de 0,36 e $p = 0,07$. Dos 50 pacientes, 32 eram D+++ e 18 não revelaram esse tipo de marcação, proporção essa que cotejada com os diversos estádios mostrou coeficiente Phi = 0,44 e $p = 0,003$.

A análise do conjunto de 32 tumores com padrão D+++ mostra que em 10 (31,2%) surgem metástases, o que indica que o valor preditivo positi-

Tabela 1 – Grau de diferenciação celular e expressão do PCNA

Grau	-	F+	P F++	C F+++	N D+	A D++	D+++	Total
Diferenciado	0	5	2	0	4	5	18	34
Moderadamente diferenciado	0	0	0	0	0	2	10	12
Indiferenciado	0	0	0	0	0	0	4	4
Total	0	5	2	0	4	7	32	50

Tabela 2 – Padrões de imunexpressão do PCNA versus estágio tumoral.

Estádio	-	F+	P F++	C F+++	N D+	A D++	D+++	Total
T ₁ N ₀ M ₀	0	5	1	0	2	3	11	22
T ₂ N ₀ M ₀	0	0	0	0	1	2	10	13
T _{3/4} N ₀ M ₀	0	0	1	0	1	2	1	5
N ₊ M _{0/+}	0	0	0	0	0	0	10	10

vo para metástases desse padrão de marcação do PCNA é de 31,2%, a sensibilidade é de 100% e a especificidade é de 45%.

DISCUSSÃO

A análise dos resultados revela relação positiva da atividade proliferativa celular medida pelo PCNA com o estágio, mas não com o grau tumoral. É possível que a falta de correlação entre padrão de coloração e o grau tumoral se deva ao tamanho da amostra, com um pequeno número de tumores indiferenciados, pois o valor encontrado para o p (0,06) está muito próximo do nível de significância.

Chama a atenção que todos os pacientes com metástases eram D+++ . Dos 18 tumores bem diferenciados com padrão de marcação D+++ , 4 (22,2%) evoluíram com metástases, o que indica que aproximadamente em 1/4 desses casos a agressividade biológica é maior. Já no grupo de 10 pacientes com tumores moderadamente diferenciados e marcação D+++ , 4 (40%) apresentaram metástases (o estágio local de 1 deles era pT1). Esse percentual foi de 50% para os tumores indiferenciados.

Os resultados deste trabalho permitem sugerir, que independentemente do estágio local (T),

os tumores bem diferenciados com padrão focal de coloração para o PCNA não necessitariam de esvaziamento ganglionar inguinal. Já aqueles corados com padrão difuso fortemente positivo, deveriam ser submetidos à linfadenectomia inguinal ou então ficar sob estrita observação para intervenção posterior caso necessário. Essa proposta, que embora pareça lógica pela análise retrospectiva, deve ser testada em estudos prospectivos no futuro para verificar se realmente traz algum benefício para os pacientes.

Não encontramos na literatura artigos sobre o PCNA em carcinoma epidermóide de pênis, o que impede qualquer comparação. Mas, o cotejamento futuro será importante, pois frequentemente são observados resultados contraditórios sobre o valor prognóstico deste e de outros marcadores tumorais, tanto em neoplasias de um mesmo tipo histológico quanto de tipos diversos (3,6,7,10,16-18), o que provavelmente se deve às variações da amostragem ou detalhes técnicos na execução dos exames. Em tumores epidermóides de outros locais, como a cavidade oral encontramos tanto artigos que revelam relação entre a imunexpressão do PCNA com o prognóstico (19), quanto que não demonstram essa relação (20).

CONCLUSÕES

A imunexpressão do PCNA mostrou correlação positiva com o estágio de carcinomas epidermóides de pênis, mas não com o grau. O PCNA parece um marcador independente e quando revela coloração forte e difusa, mesmo em tumores bem diferenciados, indica agressividade biológica maior.

*Projeto financiado pela FAPESP e pela
FAEPA- HCFMRP-USP*

*Agradecemos ao Prof. Dorival Campos do
Departamento de Genética e Matemática Aplicada
da FMRP-USP pela análise estatística*

REFERÊNCIAS

- Oyama T; Mitsudomi T; Mizone T, Ohgami T, Nakanishi R, Yasumoto K: Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol*, 4: 83-89, 1995.
- Sanchez Y, Elledge SJ: Stopped for repairs. *Bioessays*, 17: 545-548, 1995.
- Delahunt B, Betwaite PB, Thornton A, Ribas JL: Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation-resistant polyclonal Ki-67 antibody labeling. Correlation with clinical outcome. *Cancer*, 75: 2714-2719, 1995.
- Rabenhorst S, Burini R, Schmitt F: Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Rev Bras Cancerol.*, 40: 141-147, 1994.
- Kuwano H, Sumiyoshi K, Nozoe T, Yasuda M, Watanabe M, Sugimachi K: The prognostic significance of the cytophotometric DNA content and its relationship with the argyrophilic nuclear organizer regions (AgNOR) and proliferating nuclear antigen (PCNA) in oesophageal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 21: 368-373, 1995.
- Kruger S, Muller H: Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki 67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol*, 75: 480-484, 1995.
- Fradet Y, Tardif M, Bourget L, Robert L: Clinical cancer progression in urinary bladder tumors evaluated by multiparameter flow cytometry with monoclonal antibodies. Laval University Urology Group, *Cancer Res*, 50: 432-437, 1990.
- Nakano S, Kawamura J: Proliferating cell nuclear antigen expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with pathologic features and DNA content. *Hinyokita Kiyu*, 41: 343-348, 1995.
- Niezbitowski A, Rys J, Lackowska B, Laekowska B, Dyb T, Stelmach A, Bruchala A, Waslewska A, Szklarski W, Kruczak A, Swiatkiewicz I: Relationship of histology, DNA-values and proliferative activity in unselected breast cancer patients (a preliminary study). *Pol J Pathol*, 46: 23-28, 1995.
- Martins ACP, Faria SM, Rizzatti EG, Tucci Jr. S, Cologna AJ, Suaid, HJ, Velludo, MAL, Neto, MJ: Incidência de tumores urológicos em pacientes internados no Hospital das Clínicas - FMRP-USP. *Acta Cir Bras*, 12 (supl 1): 15-17, 1997.
- Cabanas RM: Anatomy and sentinel lymph nodes. *Urol A A*, 19: 267-272, 1992.
- Catalona WJ: Role of lymphadenectomy in carcinoma of the penis. *Urol Clin North Am*, 7: 785-792, 1980.
- Theodorescu D, Russo P, Zhang ZF, Morash C, Fair WR: Outcomes of initial surveillance of invasive squamous cell carcinoma of the penis and negative nodes. *J Urol*, 155: 1626-1631, 1996.
- Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, Young L, Iman SA, Cote RJ: Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol*, 25: 263-270, 1994.
- Hsu SN, Raine L, Sanger H: The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between

- ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29: 577-580, 1981.
16. Iachino C, Katsikoyiannis N, Dallera F: Assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity in exocrine pancreatic carcinomas. *Pathologica*, 87: 56-58, 1995.
 17. Maeda K, Chung YS, Takatsura S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Kondo Y: Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer*, 72: 319-323, 1995.
 18. Resnick JM, Ullman D, Niehans GA, Gspsny M, Adams G, Knapp D, Jagcz W: Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 104: 685-694, 1995.
 19. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Miura K, Murata T, Kajiyama M: The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 protein correlate with prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 90: 6-13, 1999.
 20. Sommer T, Olofsson J: Significance of p53, PCNA and Ki-67 in the prognosis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Laryngorhinootologie*, 76: 189-196, 1997.

Received: July 20, 1999

Accepted after revision: January 26, 2000

RESUMO

CARCINOMA DE PÊNIS: IMPORTÂNCIA DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Objetivo: Comparar a imunoexpressão do PCNA com a agressividade biológica (estádio e grau) do carcinoma epidermóide do pênis.

Material e Métodos: No período 1976/1995, 50 pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, idades entre 32 e 80 anos, média de 58,2 anos, foram submetidos à penectomia total ou parcial e em 15 deles associou-se linfadenectomia inguinal por suspeita de metástases. As peças mantidas em arquivo foram reexaminadas pela histologia convencional com coloração hematoxilina-eosina e recuperadas para estudo imunohistoquímico do PCNA, método da avidina-biotina-peroxidase. As metástases ocorreram em 4 de 34 tumores diferenciados, em 4 de 12 tumores moderadamente diferenciados e em 2 dos 4 tumores indiferenciados.

Resultados: Padrão forte de marcação difusa (D+++) foi observado em 18/34 tumores diferenciados, em 10/12 moderadamente diferenciados em 4/4 indiferenciados. O cotejamento grau versus marcação D+++ mostrou $p = 0,06$. A análise das proporções entre esse padrão de marcação e estágio mostrou diferença mais expressiva ($p = 0,003$). Todos os tumores com metástases eram D+++ , incluindo-se 4/18 diferenciados e 4/10 moderadamente diferenciados.

Conclusão: O estudo mostra uma forte correlação entre a imunoexpressão do PCNA e o estágio, mas não com o grau do tumor. O marcador parece independente e com potencial para nortear a conduta inicial em portadores da neoplasia.

Unitermos: pênis, câncer, carcinoma epidermóide de pênis, PCNA, prognóstico
Braz J Urol, 26: 38-42, 2000

Correspondence address:

Antonio Carlos Pereira Martins
 Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Campus
 Departamento de Cirurgia
 Av. Bandeirantes, 3900
 Ribeirão Preto, SP, 14049-900
 Fax: (16) 633-0836
 E-mail: acpmarti@fmrp.usp.br