



Estudi de factors pronòstics genètics i moleculars en el carcinoma escatós de penis i relació amb el virus del papil·loma humà

Emili Masferrer i Niubò



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



Estudi de factors pronòstics genètics i moleculars en el
carcinoma escatós de penis i relació amb el virus del
papil·loma humà

Tesi presentada per

Emili Masferrer i Niubò

Per obtenir el títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida per:

Dr. Agustí Toll i Abelló (director)

Dr. Octavi Servitje i Bedate (tutor)

Programa de doctorat Medicina

Universitat de Barcelona

2014



Health Universitat de
Barcelona
Campus



PRESENTACIÓ

La present Tesi Doctoral s'estructura, seguint les directrius de la normativa per a la presentació de tesi doctorals aprovada pel consell del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona, com un compendi de publicacions.

Els estudis que conformen aquesta Tesi Doctoral pertanyen a una mateixa línia d'investigació, destinada a avaluar la presència i implicació de diverses alteracions genètiques i moleculars en la patogènia del carcinoma de penis.

Els resultats d'aquests estudis han aportat informació rellevant i novedosa en aquest camp, i han estat recollits en 2 articles originals publicats a revistes internacionals, amb un índex d'impacte global de 7.72.

A tots els homes

AGRAÏMENTS

Són moltes les persones sense les quals aquesta tesi no hagués estat possible i a les que estic francament agraït. Amb alguns, abans de dedicar-me al món dels penis ja hi mantenía una gran amistat (i l'hem reforçat després de tants treballs ;-)) i a d'altres no els hagués conegut si no hagués estat per aquesta tesi. Només pel gran nombre de nous amics que he fet gràcies a aquesta treball ja ha valgut la pena l'esforç.

En primer lloc vull mencionar el director, amb qui tantes vegades m'han confós els pacients, fins al punt, que per molts em vaig transformar en el Dr. Toll. Ell m'ha aportat boníssimes idees, presentat moltíssima gent i el que és més important, ha tingut una paciència infinita per anar corregint una i una altra vegada els articles fins a deixar-los presentables pels editors. Dr. Toll, moltes gràcies de tot cor.

Al Dr. Ramon M. Pujol, qui va engrescar-me a fer la tesi i va donar-me l'oportunitat d'estudiar el gran món dels penis. Encara recordo aquell dia al juny del 2009 que digué: "Emili no t'interessaria fer FISH d'uns TMAs?" Poques frases han tingut tantes i tant bones repercussions en la meua vida com aquesta (a més d'aprendre que abans de dir que sí, has de buscar al diccionari el significat de FISH i TMA).

A la Dra. Inma Hernández qui m'introduí en el món de la transició epitelial mesènquima i del policom (del segon encara no n'he entès un borrall ☺)

Al Dr. Vicenç García-Patos per facilitar aquesta col·laboració interhospitalària i per les seves aportacions al treball.

Al Dr. Octavi Servitje, tutor d'aquesta tesi, i a tots els adjunts de dermatologia de l'Hospital de Bellvitge, que em formaren en aquesta especialitat i em feren estimar-la. També als meus co-residents de Bellvitge, en especial a la Dra. Alba Álvarez per convidar-me a participar en el seu treball d'escatosos de penis.

Vull mencionar també al Dr. José Placer, l'uròleg que va començar a fer TMA's amb els penis de l'hospital i a fer FISH. Ell va posar els fonaments d'aquest treball. També agrair la seva col·laboració a tots els altres uròlegs de l'hospital del Mar i de l'Hospital del la Vall d'Hebron en especial al Dr. Antoni Gelabert i al Dr. Alfredo Rodríguez-Rodríguez i també al Dr. Antoni Pont uròleg de l'Hospital de Sant Joan de Reus.

A la Dra. Marta Salido (quina il·lusió poder-li dir dra.) amb qui tants bons moments vaig compartir a la "quiquera" i que tant suport em va donar als moments no tant bons. També un agraïment cap a la Maria Rodríguez, la Dra. Blanca Espinet, el Dr. Francesc Solé, a la Dra. Ana Belén Galván i a tots els altres membres del laboratori de patologia molecular que han fet possible aquesta tesi.

A la patòloga Dra. Belén Lloveras per la seva ajuda en el camp de la histologia i en el VPH i a tot l'equip de l'Institut Català d'Oncologia en especial a la Dra. Laia Alemany. També a la Dra. Mar Iglesias patòloga pel seu suport en aquest treball.

A la Tania Lobato pel seu treball de laboratori en especial la realització dels *arrays* tissulars.

A la Dra. Carla Ferrándiz, amb qui hem recorregut conjuntament aquest llarg camí, companya de fatigues, ha estat per mi un exemple de rigor, de feina ben feta i un model a seguir. A més de felicitar-la des d'aquí per la seva tesi recentment presentada, també la vull felicitar per la seva propera maternitat 😊.

A la Dra. Inmaculada Gil per la seva aportació de mostres per a la realització de cultius cel·lulars i a tots els altres dermatòlegs que treballen a l'Hospital del Mar o ex-residents del Mar que de manera directa o indirecta heu col·laborat en aquest treball.

Al Dr. Antonio García de Herreros per les seves aportacions en el camp de la TEM.

A l'estadístic Sergi Mojal i la matemàtica Magalí Masferrer per tota la feina que han hagut de fer gestionant enormes bases de dades i interpretant-les.

A la Dra. Eugenia Hernández, que m'ha agafat el relleu en aquest món tant obtús del policom (espero que algun dia l'arribaré a entendre 😊).

Al Dr. Xevi Biarnés per la seva aportació a c.Myc.

Al gran fotògraf Miquel Taverna, per la seva ajuda en les composicions fotogràfiques.

A la meua dona, la Dra. Laia Miquel principalment pel suport incondicional i també per les seves aportacions en el camp de l'estadística i, sobretot, del sentit comú, que m'han ajudat a poder portar aquest treball a bon terme. Com diu el refrany: "detrás de un gran hombre, hay una mujer sorprendida".

I finalment al petit Pol, que no ha fet res, però com és un mimat també l'hi poso.

Els treballs presentats en aquesta tesi han estat finançats gràcies a les

següents ajudes:

1.- Instituto Carlos III/FEDER: PI04/1728, RD09/0076/00036, PS09/00973, PI10/00785.

2.- Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca AGUAUR: 2009SGR 1409.

3.- Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM): Beca per la finalització de tesi doctorals.

Resum

El carcinoma escatós de penis és un tumor molt rar al nostre medi però que pot ser potencialment mortal pels pacients que el pateixen. En aquest estudi s'han buscat marcadors immunohistoquímics i per FISH que puguin ser usats com a marcadors pronòstic d'aquesta malaltia.

En el primer treball s'estudià el gen *MYC* per FISH i l'expressió proteica de Myc per immunohistoquímica en 79 casos de CEP. Vàrem descriure un augment d'aberracions numèriques en el CEP a mesura que progressa la malaltia. A més a més es demostrà una associació entre els guanys de *MYC* i el mal pronòstic de la malaltia. No es va trobar cap relació entre els guanys de *MYC* i la presència del VPH però sí que es va trobar una associació significativa entre la presència del VPH i la sobreexpressió de Myc.

En el segon treball s'estudià el fenomen de transició epiteli-mesènquima en el CEP. Es va estudiar per immunohistoquímica l'expressió de Caderina-E, Vimentina i dels factors de transcripció Snail, Twist i Zeb1. El fenomen de TEM es va observar en un 43.5% dels CEPs. La presència del VPH es va associar a la TEM. Les nostres troballes suggereixen que la TEM s'associa a un augment de la mortalitat en el CEP i que el VPH podria estar implicat en aquest procés.

Abstract

Penile squamous cell carcinoma (PSCC) is a rare tumor in our area but can be life threatening to patients affected. In this study we have looked for potential prognostic markers for this disease.

In the first paper, we studied the *MYC* gene by FISH and Myc protein expression by immunohistochemistry in 79 cases of PSCC. We observed that *MYC* gains progressively increased during PSCC progression from *in situ* samples to metastases. Furthermore, we demonstrated an association between *MYC* gains and bad outcome. We did not find any relationship between *MYC* gains and the presence of HPV where a significant association between the presence of HPV and overexpression of Myc was found.

In the second paper, the phenomenon of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in PSCC was assessed. We studied by immunohistochemistry the expression of E-Cadherin, Vimentin and the transcription factors Snail, Twist and Zeb1. The presence of HPV was associated with EMT. EMT phenomenon was observed in 43.5% of the evaluated samples. Our findings suggest that EMT is associated with an increased mortality in PSCC and that HPV could be implicated in this process.

ÍNDEX

ÍNDEX

LLISTAT D'ABREVIATURES	2
INTRODUCCIÓ	6
CARCINOMA ESCATÓS DE PENIS	6
EPIDEMIOLOGIA	6
FACTORS DE RISC	7
PRESENTACIÓ CLÍNICA	9
HISTOLOGIA	13
ETIOPATOGENÈIA	16
ESTADIFICACIÓ	18
BUIDAMENT GANGLIONAR.....	20
TRACTAMENT	22
ALTERACIONS MOLECULARS EN EL CARCINOMA DE PENIS	27
MYC.....	27
TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA	30
TÈCNiques DE LABORATORI REALITZADES.....	31
DETECCIÓ DEL VPH.....	31
MICROMATRIUS DE TEIXIT.....	32
HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> FLUORESCENT (FISH).....	34
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	40
HIPÒTESI	40
OBJECTIUS.....	40
RESULTATS	44
ARTICLE 1: <i>MYC</i> copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. J Urol. 2012 Nov;188(5):1965-71.....	44
ARTICLE 2: Epithelial to mesenchymal transition in penile squamous cell carcinoma. J Urol. 2015.....	53

DISCUSSIÓ.....	84
CONCLUSIONS	94
BIBLIOGRAFIA	98

LLISTAT D'ABREVIATURES

LLISTAT D'ABREVIATURES

ADN: Àcid desoxiribonucleic

CEC: Carcinoma escatós de cèrvix

CEP: Carcinoma escatós de penis

CEV: Carcinoma escatós de vulva

EQ: Eritroplàsia de Queyrat

FCHD: Factor de creixement derivat de l'hepatoma

FISH: Hibridació *in situ* fluorescent

HSH: Homes que tenen sexe amb homes

LE: Lliquen esclerós

LP: Lliquen pla

MB: Malaltia de Bowen

mTOR: Diana de rapamicina de les cèl·lules de mamífers

PB: Papulosis Bowenoide

PCR: Proteïna C reactiva

pRB: Proteïna de retinoblastoma

RCP: Reacció en cadena de polimerases

rFCE: Receptor del factor de creixement epidèrmic

TMA: Micromatrius de teixit

VPH: Virus del papil·loma humà

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

CARCINOMA ESCATÓS DE PENIS

EPIDEMIOLOGIA

El carcinoma escatós de penis (CEP) és una neoplàsia poc freqüent al nostre medi, però que representa més del 95% dels tumors malignes d'aquesta localització. La seva freqüència és molt variable entre poblacions. A Europa i als Estats Units té una incidència d'un 0,3-1/100000 homes,¹ però als països subdesenvolupats d'Àsia, Àfrica i Sud-Amèrica pot representar el 10% del total de neoplàsies masculines, amb incidències de fins a 8,3/100000 homes a Brasil.² La taxa més baixa es dona entre la comunitat jueva israelita (0,1/100000).³ Aquestes amplies variacions d'incidències estarien justificades no només per diferències socioeconòmiques si no també culturals.

És un tumor més freqüent a l'edat adulta, apareixent la majoria dels casos entre els 50 i 70 anys, però en un 19% dels casos apareix en pacients de menys de 40 anys i en un 7% en pacients de menys de 30 anys.⁴

Es pot localitzar a qualsevol part del penis, però a la meitat dels casos es desenvolupa a partir de l'epiteli del gland i en un 20% al prepuci.⁵

Els principals avenços en el CEP durant els últims anys s'han centrat en la identificació dels factors de risc, en l'estudi de les vies moleculars implicades en el seu desenvolupament i en l'actualització de l'estadiatge. També hi ha hagut avenços en el seu tractament, amb tendència a realitzar una cirurgia cada cop

més conservadora que, minimitzant el risc de recidiva, preservi la funció sexual i urinària.

FACTORS DE RISC

S'han identificat diversos factors de risc pel seu desenvolupament, els més importants són: la fimosi, una mala higiene del penis i la infecció pel virus del papil·loma humà (VPH).

Mala higiene del penis i fimosi

La fimosi és aquella condició en que el prepuci no pot ser retret. Pot ser congènita o adquirida. Hi ha diverses condicions que ho poden provocar, sent les més freqüents la balanopostitis crònica, les infeccions de repetició, el líquen esclerós i atròfic i la diabetis mellitus.

S'ha proposat que una mala higiene del penis *per se* afavoriria el desenvolupament de càncer. La falta d'higiene promouria la balanopostitis crònica i les infeccions de repetició. La relació entre aquestes i el desenvolupament de la neoplàsia no està clara, però es pensa que podria ser deguda a un risc augmentat de desenvolupar fimosis,⁶ i al mateix temps, la fimosis dificultaria una higiene adequada, incrementant el risc de balanopostitis i infeccions. També facilitaria la retenció d'esmegma, material que resulta de la descamació de l'epiteli, la secreció de las glàndules de Tyson i la degradació de bacteris. L'esmegma també causaria una irritació de la zona augmentant el risc de CEP però encara no hi ha consens en si és carcinogènic o no.⁷

Virus del papil·loma humà

El VPH conforma un grup de virus d'ADN que pertanyen a la família *Papillomaviridae*. Se n'han identificat més de 100 tipus diferents, però no tots són oncogènics. Es poden classificar en 2 grans grups segons el seu grau d'oncogenicitat:⁸

- Alt risc: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
- Baix risc: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
- Probablement oncogènics: 26, 53, 66

La infecció pel VPH sembla que té un paper important a la patogènesi del carcinoma escatós de penis tant en els *in situ* com en els invasors. El VPH s'ha detectat entre el 70-100% dels casos de CEP *in situ*,^{9,10} en canvi en el CEP invasor només s'ha identificat entre un 22 i un 60%.^{9,11,12} El més freqüent és aïllar serotipus d'alt risc, sobretot el VPH-16, que s'aïlla en dues terceres parts dels casos, seguit del VPH-18, en un 13,3%. Els següents en freqüència, però molt més rars, serien els tipus 31 i 33. En un 8% dels casos s'han trobat tipus de baix risc, com el VPH-6 i 11, però el seu paper no està ben definit i alguns autors pensen que podrien ser acompanyants, doncs aquests malalts sovint també tenen o han tingut condilomes acuminats (infecció causada pels virus de baix risc oncogènic).¹²

Hi ha una discordança entre l'alta prevalença del virus en els casos *in situ* i la baixa prevalença dels invasors. Això suggereix que els CEP *in situ* serien precursors només d'una part dels invasors. El VPH es detecta sobretot a les variants basaloide, condilomatosa i mixta sent molt menys freqüent en les

variants comuns, sarcomatoides i berrugoses.⁹ Així trobaríem que hi ha dos tipus de CEP uns relacionats amb el VPH i uns no relacionats amb el virus.

Malalties inflamatòries cròniques del penis

Els processos inflamatoris crònics, com el líquen pla (LP), líquen esclerós (LE) i la seva forma més avançada la balanitis xeròtica, en les que apareix una fibrosis constrictiva que afecta a tota la circumferència del prepuci, i impedeix la seva retracció, també es relacionarien amb el CEP. Així entre un 28% i un 50% dels homes amb CEP tenen antecedents de LE. El LE es relacionaria amb les variants de CEP VPH negatives com són el comú i el berrugós.¹³

Altres

Hi ha altres factors de risc associats a l'aparició del carcinoma escatós de penis com són la PUVA-teràpia sense protecció genital, el tabaquisme (fumat, mastegat), la balanitis micàcia, la banya cutània, la presència de condilomes acuminats o la immunosupressió.^{14,15}

PRESENTACIÓ CLÍNICA

Neoplàsies intraepitelials

El terme neoplàsia intraepitelial (PeIN) correspon als CEP *in situ* i inclou a tres entitats clíniques diferents: la papulosis bowenoide (PB), l'eritroplàsia de

Queyrat (EQ) i la malaltia de Bowen (MB). Tot i que aquestes tres variants tenen característiques histològiques similars, doncs són totes CEP *in situ* presenten característiques clíniques, epidemiològiques i pronòstiques diferents.

S'han proposat altres terminologies per designar els carcinomes *in situ* de penis incloent la baixa, moderada i severa displàsia; PIN 1, 2 i 3; alt i baix grau de "squamous intraepithelial lesions" (SIL) i més recentment una classificació entre bowenoide i PIN diferenciat.¹⁶ El PIN bowenoide estaria induït pel VPH i afectaria a dos terços de l'epidermis i en canvi el PIN diferenciat seria VPH negatiu, s'associaria al líquen esclerós i les cèl·lules displàsiques afectarien només la basal i parabasal de l'epiteli. Tot i que aquesta última classificació sembla la més apropiada doncs té en compte la patogènia i les diferències histològiques mantindrem la classificació clàssica de PB, EQ i MB en ser la més usada a la literatura.

- Papulosi bowenoide

Aquesta entitat es presenta en forma de petites pàpules pigmentades que poden unir-se formant plaques, habitualment en el tronc del penis, en homes sexualment actius. Sovint s'associa a la infecció pel VPH-16. Tot i que habitualment presenta un curs benigne, hi ha casos que poden evolucionar a un CEP. A vegades regressen espontàniament.¹⁷ (Imatge 1A).

- Malaltia de Bowen

La malaltia de Bowen correspon al carcinoma intraepitelial de l'epiteli de la l'epidermis del penis. Es propi de pacients d'edat avançada apareixent majoritàriament al cos del penis. Es presenta com una placa eritematosa,

descamativa i de creixement molt lent. El risc de transformació a CEP és del 5%.¹³ (Imatge 1B).

- Eritroplàsia de Queyrat

L'eritroplàsia de Queyrat és un carcinoma intraepitelial que afecta a la mucosa. Es presenta en forma de pàpules o plaques, solitàries o múltiples, eritematoses, brillants, de vores ben definides afectant el gland o cara interna del prepuci. Habitualment es presenta en pacients d'edat avançada i no circumcidats. Fins a un 30% dels casos poden evolucionar a CEP.¹⁸ (Imatge 1C).



Imatge 1. A: Papulosis Bowenoides: diverses pàpules pigmentades localitzades al tronc del penis. B: Malaltia de Bowen: placa eritematosa ben delimitada al tronc del penis. C: Eritroplàsia de Queyrat: placa eritematosa al gland.

Carcinoma escatós de penis invasiu

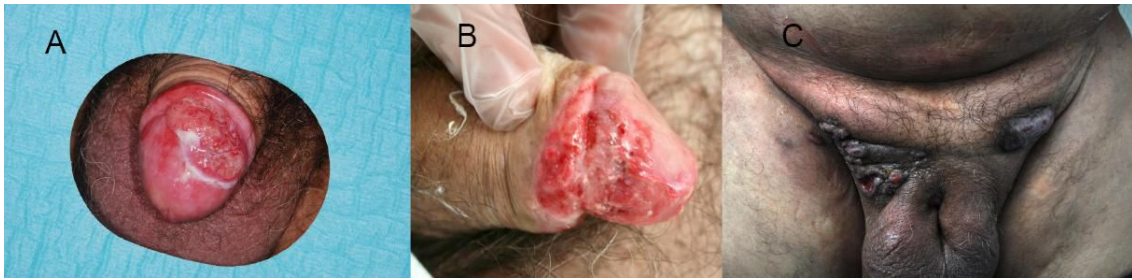
El CEP pot aparèixer a qualsevol part del penis, però quasi la meitat dels casos es localitza al gland (48%) i en una cinquena part al prepuci (21%). Altres

localitzacions menys freqüents són la coafectació de gland i prepuci (9%), solc balanoprepucial (6%) o el cos del penis (<2%).¹³ La forma clínica de presentació és molt variable, des d'una lleugera induració pruriginosa, eritematosa, lleugerament elevada; un tumor d'aspecte berruciforme o una lesió exofítica, friable, ulcerada que deixada a la seva evolució pot acabar auto amputant el penis. Els símptomes poden ser picor, cremor, dolor, sagnat i mala olor.¹⁹

Pot presentar dos patrons de creixement: un creixement papil·lar (Imatge 2A) i un creixement pla. Les lesions papil·lars típicament apareixen al gland o a la part mucosa del prepuci i es presenten com una o diverses lesions berrugoses. A mesura que el tumor va creixent, en créixer per sobre de seu suport sanguini, s'acaba ulcerant i infectant. Les lesions planes solen ser més petites, superficials, amb ulceració central i vores lleument elevades. Tenen un creixement lateral i en profunditat (Imatge 2B).

Dues terceres parts dels pacients presenten una malaltia localitzada,²⁰ tot i que, en un 50% dels pacients, hi ha un retard en el diagnòstic de més d'un any des de l'inici dels símptomes, perquè els pacients triguen a consultar al metge.

Fins en un 50% dels pacients podem trobar adenopaties palpables, però només en un 50% dels casos són degudes a metàstasis ganglionars (Imatge 2C). Els altres casos, són degudes a adenopaties secundàries a infeccions del tumor. Per altra banda, fins un 20% dels malalts sense adenopaties palpables, al moment del diagnòstic ja presenten micrometàstasis.¹³



Imatge 2. A: CEP amb patró de creixement papil·lar localitzat al gland B: CEP amb patró de creixement ulceratiu localitzat a solc balano-prepucial. C: Pacient amb aparició de metàstasis ganglionars 1 any després d'una penectomia total per tractar un CEP.

HISTOLOGIA

Neoplàsies intraepitelials

La PB es caracteritza per una hiperplàsia epidèrmica psoriasiforme amb presència, de forma aïllada, de queratinòcits amb grans nuclis atípics, així com presència d'alguna mitosi, alguna cèl·lula necròtica aïllada i presència de disqueratosi. En general destaca la presència de signes de malignitat en una lesió que sovint evidencia un patró arquitectural benigne.

La MB i l'EQ són histològicament molt similars: presenten acantosi, paraqueratosi o hiperqueratosi amb una falta de maduració de l'epiteli i atípia a tot l'epiteli.

CARCINOMA ESCATÓS DE PENIS

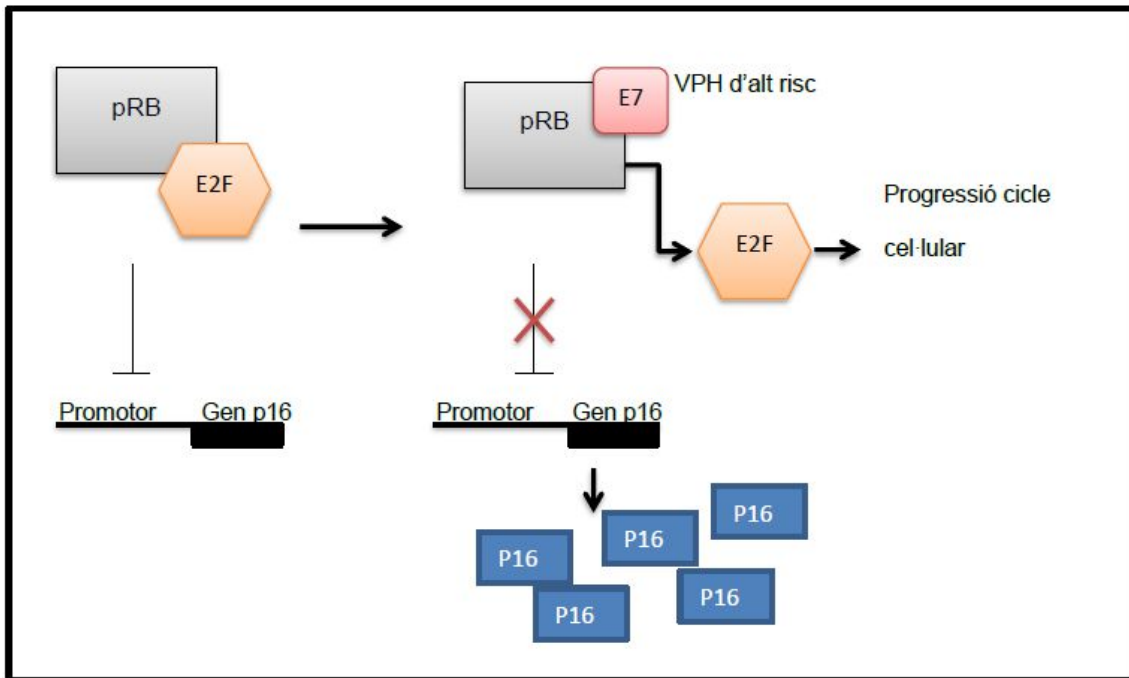
Hi ha diverses variants de CEP en funció de les seves característiques clíniques. El més freqüent és el comú o queratinitzant (49-65%). Les altres varietats són: basaloide (4%), condilomatós (6-7%), berrugós (7-8%), papil·lomatós (5-7%), sarcomatoide (1%) i adeno-escatós (1%). A més a més pot haver-hi formes mixtes en que hi ha combinacions de les diferents formes histològiques en el mateix tumor.^{9,13} Cada forma histològica té unes característiques i un pronòstic diferenciat. (Taula 1).

Taula 1. Característiques i pronòstic de les diverses formes de CEP

Tipus histològic	Característiques	Pronòstic
Basaloide	Presència de nius infiltrants moderadament o pobrament diferenciats; presència de coilocits; cèl·lules amb citoplasma petit, basòfiles, monomorfes i de mida petita amb presència de múltiples mitosis	Tumors d'alt grau histològic amb un pronòstic dolent. Gran capacitat d'invasió en profunditat. Gran capacitat d'infiltració vascular i perineural.
Sarcomatoide	Cèl·lules tumorals molt atípiques amb un patró angiosarcomatós	Alta taxa de metàstasis limfàtiques i de recurrència
Adeno-escatós	Nius tumorals formats per dues parts ben diferenciades: un component sòlid semblant CEP comú i presència d'adenocarcinoma mucinós	Tumors de baix grau. Invasió més superficial. Excepcionalment fan invasió vascular o perineural
Condilomatós	Berruciforme amb part central fibrovascular; infiltra a certa profunditat; les cèl·lules presenten coilocitosi	
Berrugós	Ben diferenciat; presència d'acantosi i hiperqueratosi; papil·lomatosi amb una base àmplia amb tendència a la pressió més que no a la invasió; absència de coilocits; els nuclis són rodons o lleugerament irregulars	
Papil·lomatós	Tumor berruciforme amb papil·les arboritzants amb part central fibrovascular, base irregular i absència de coilocits.	
Comú	Cèl·lules d'epiteli escamós atípiques que formen nius amb capacitat d'envair; presència de cèl·lules disqueratòsiques; queratinització central prominent, amb presència de perles còrnies, atípia nuclear	Pronòstic intermedi respecte dels anteriors
Mixt	Combinació d'una variant comuna amb un altre tipus histològic, sent el basaloide i el berrugós els més freqüents	

ETIOPATOGENÈIA

Hi ha dos tipus de CEP, uns induïts pel VPH i uns no induïts pel VPH. Els CEP induïts pel VPH es desenvolupen a partir de lesions de carcinoma escatós intraepitelial (PeIN). El virus inactiva proteïnes reguladores del cicle cel·lular a partir de dues oncoproteïnes (presentes només en els VPH d'alt risc). L'oncoproteïna E7 que hipofosforila la proteïna de retinoblastoma (pRB) i l'oncoproteïna E6 que inactiva p53.²¹ Això implica una aparició de cèl·lules autònomes amb un cicle cel·lular activat que no és aturat a la fase G1 i l'acumulació de l'inhibidor de les cinases dependents de ciclins p16 al nucli cel·lular (Imatge 3). Per aquest motiu la determinació de p16 permet detectar de manera indirecte la infecció per VPH d'alt risc.⁹ Els VPH de baix risc, no tenen les oncoproteïnes E6 ni E7, pel que la seva infecció no s'acompanya d'un augment de p16.



Imatge 3: Mecanisme pel que la proteïna E7 dels VPH d'alt risc actua sobre el cicle cel·lular augmentant p16 al nucli cel·lular.

No coneixem tant bé l'etiopatogènia dels CEP no relacionats amb el VPH, però sabem que hi està implicada la p53 i que seria similar a la del carcinoma de vulva. La lesió precursora seria el PeIN ben diferenciat, que trobem sovint a la pell peritumoral dels CEP no relacionats amb VPH apareguts en pacients amb LP o LE. Aquests casos presenten sobreexpressió de p53 als queratinòcits atípics de la capa basal. Cal remarcar que, tot i que histològicament l'atípia amb hiperqueratinització superficial sovint és subtil, el PeIN diferenciat es considera d'alt grau i sol tenir una ràpida progressió a càncer invasiu.²²

ESTADIFICACIÓ

L'estadificació es farà en base al TNM (Taula 2 i 3). A més a més és recomanable recollir altres factors pronòstic com són: distingir entre la invasió del cos esponjós i el cos cavernós, percentatge del tumor que és pobrament diferenciat, profunditat de la invasió en el cas dels carcinomes berrugosos, mida de les metàstasis limfàtiques i presència del VPH.

Taula 2. Estadificació TNM

Estadi	Característiques
Tumor (T)	
TX	No és possible saber on és el tumor primari
T0	No hi ha evidència de tumor primari
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
Ta	Carcinoma berrugós no invasiu
T1a	El tumor envaeix el teixit connectiu subepitelial sense afectar a limfàtics i no és pobrament diferenciat
T1b	El tumor envaeix el teixit connectiu subepitelial amb infiltració limfàtica o és pobrament diferenciat
T2	El tumor envaeix el cos esponjós o el cos cavernós
T3	El tumor envaeix la uretra
T4	El tumor envaeix altres estructures
Ganglis classificació clínica (cN)	
cNX	No es poden estudiar els ganglis
cN0	No hi ha ganglis palpables ni visibles
cN1	Gangli limfàtic palpable unilateral i mòbil
cN2	Ganglis limfàtics múltiples i mòbils tant unilaterals com bilaterals
cN3	Múltiples adenopaties inguinals fixes o presència d'adenopaties pelvianes tant unilaterals com bilaterals
Ganglis classificació histològica (pN)	
pNX	No es poden estudiar els ganglis
pN0	Absència de metàstasis limfàtiques
pN1	Metàstasi limfàtica única
pN2	Metàstasis inguinals ganglionars múltiples uni o bilaterals
pN3	Presència d'extensió extraganglionar de la metàstasi limfàtica o presència d'adenopaties pelvianes uni o bilaterals
Metàstasis (M)	
M0	Absència de metàstasis a distància
M1	Metàstasis a distància

Taula 3. Grups pronòstic

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

BUIDAMENT GANGLIONAR

Com el CEP és un tumor poc freqüent i té una taxa petita de micrometàstasis, hi ha poca informació a les guies clíniques pel que fa al buidament ganglionar. De fet no hi ha cap estudi randomitzat que analitzi els efectes de fer una limfadenectomia immediata. Si sabem que aquells pacients a qui es realitzen limfadenectomies immediates que tenien metàstasis ganglionars ocultes tenen millor supervivència que aquells a qui es va fer observació i no es va realitzar la limfadenectomia fins que ja presentaven signes clars de progressió de la malaltia.^{23,24,25,26} És per aquest motiu que és tant important poder definir a priori

quins malalts tenen alt risc de fer metàstasis inguinals i realitzar-los-hi limfadenectomies immediates.

La limfadenectomia immediata, feta als malalts apropiats, permet una correcta estadificació del pacient, ens dona informació pronòstica i a més a més té un cert potencial curatiu.²⁷ Així aquells pacients amb menys de tres adenopaties inguinals afectes, sense afectació extralimfàtica, ni pelviana són els més beneficiats del que podríem anomenar “limfadenectomia immediata curativa”. Aquests pacients tenen una supervivència als 5 anys de quasi un 80%.²⁷ En canvi aquells pacients amb afectació de tres o més ganglis o afectació extraganglionar la supervivència als 5 anys és del 25% i els pacients que presenten afectació pelviana, la supervivència als 5 anys és només del 10%.²⁷

S'han descrit diversos factors associats al risc de presentar metàstasis ganglionars, com són: el tipus histològic, la mida del tumor, el grau de diferenciació, la presència d'invasió venosa o limfàtica, l'espessor tumoral i el patró de creixement (Taula 4). Els pacients en un estadi T1 o menor, sense alteracions histològiques d'alt grau, i sense signes d'afectació limfovascular, tenen menys d'un 10% de risc de desenvolupar metàstasis limfàtiques i seran tributaris a control clínic.²⁷ Aquells pacients en estadi T2 o superior, amb canvis histològics d'alt grau o afectació limfovascular tenen un risc de més del 25% i seran els candidats a una limfadenectomia immediata.

Taula 4. Factors de risc per l'aparició de metàstasis

Factor pronòstic	Interpretació
Tipus histològic	El tipus basaloide té al risc de metàstasis i el berrugós molt poc. La variant comuna tindria un risc intermedi
Mida de la lesió	Hi ha una correlació directa entre l'extensió local del tumor primari i el risc de metàstasis
Grau histològic	Els tumors poc diferenciats tenen més risc de metàstasis
Presència d'invasió limfàtica o venosa	La presència d'èmbols tumorals al sistema limfàtic o venós és un factor predictiu independent del risc de metàstasis
Espessor tumoral	Un gruix >5mm s'associa a major risc de metàstasis
Patró de creixement	Els tumors amb creixement vertical, endofític i amb un patró infiltratiu tenen més risc de metàstasis que aquells que són superficials, exofítics i amb un patró d'infiltració tipus per "compressió"

TRACTAMENT

El tractament depèn de l'estadi del tumor i podrà ser quirúrgic, per radioteràpia o tractament mèdic, usats sols o en combinació.

L'objectiu és l'exèresi de la lesió amb marges adequats reduint al màxim la desfiguració anatòmica. L'exèresi quirúrgica és la tècnica més usada, però hi ha algunes tècniques menys invasives com són la criocirurgia, l'electrocoagulació + curetatge, làser ablatiu, teràpia fotodinàmica i els tractaments tòpics.

- Crioteràpia o electrocoagulació + curetatge

Poden usar-se per carcinomes escamosos *in situ* però no permeten tenir un control de la profunditat de la lesió i presenten moltes molèsties

postquirúrgiques,²⁸ per aquest motiu són tècniques que s'usen en molt poques ocasions.

- Tractament tòpic

Són una alternativa als tractaments quirúrgics, limitats també als casos de carcinoma *in situ*. Hi ha casos descrits de pacients tractats amb 5-fluorouracil,²⁹ imiquimod 5%³⁰ i cidofovir tòpic.³¹ En una revisió retrospectiva de pacients amb un carcinoma escatós *in situ* tractats amb primera línia amb 5-fluorouracil 5% i de segona línia amb imiquimod 5% s'obtingueren respostes completes en un 57% dels casos, parcials en un 13'6% i sense resposta un 29,5%.³² Són per tant uns medicaments amb una eficàcia moderada, però bastant ben tolerats i amb una conservació anatòmica del membre completa pel que poden ser una bona opció en els casos de carcinoma *in situ*.

- Tractaments amb làser

Pel tractament dels carcinomes escatosos *in situ* cal usar làsers ablatius com són: el làser CO2, el làser Neodinium-YAG i el làser KTP (làser de potassi-titanil-fosfat).^{33,34} Els estudis demostren que les recidives són poc freqüents i poden ser tractades de nou amb el làser.^{33,34} En algunes ocasions no només s'ha tractat els Tis amb bons resultats si no també T1 i algun T2 ben seleccionat.³⁴

- Teràpia fotodinàmica

La teràpia fotodinàmica amb àcid 5-aminolevulínic o el metil-aminolevulinat també s'ha usat amb èxit pel tractament del carcinoma escatós de penis *in situ*. Hi ha diversos casos publicats amb bona resposta, i preservació anatòmica i

funcional del penis, però precisa molt seguiment i control, doncs les recurrències no són infreqüents.^{35,36}

- Escissió quirúrgica

Té l'avantatge que ens permet saber la profunditat del tumor i comprovar si s'extirpa amb marges lliures de lesió. Històricament es recomanava realitzar exèresis amb 2 cm de marge, però actualment es realitzen intervencions amb marges més ajustats de cara a preservar la funcionalitat de l'òrgan.

Molts pacients amb CEP no estan circumcidats. En els tumors de baix grau, petits, en estadis inicials i limitats a la zona distal del prepuci, la realització d'una circumcisió pot ser suficient per a curar el pacient.

Com el 80 % dels tumors afecten a la zona del gland sovint es poden plantejar cirurgies amb preservació de la funcionalitat del penis. Quan es facin glandectomies parcials, és recomanable realitzar una histologia peroperatòria del cos cavernós i de la uretra per assegurar uns marges lliures abans de la reconstrucció. Parlem de glandectomia parcial quan després de la intervenció persisteix una part del gland. En la glandectomia total, tot el gland és extirpat completament. Si hi ha afectació de la túnica albugínia, s'ha de fer a més a més una corporectomia distal.

La desepitelització del gland, consisteix en l'exèresi de l'epiteli i el subepiteli de tot o part del gland. Aquest mètode, que pot acompanyar-se o no de cirurgia de Möhs, és segur i eficaç en els carcinomes *in situ*.

La penectomia parcial, és la tècnica més usada pel tractament del CEP.³⁷ Aquesta tècnica s'usarà quan el tumor afecti una zona distal però no puguem

usar mesures més conservadores o en casos de recurrència després d'un tractament conservador.³⁷

La penectomia total es realitzarà en aquells casos que per mida o localització no ens permetin fer una escissió menor que permetés al pacient la micció en bipedestació.³⁷ La penectomia total es diferencia de la radical en que en la primera s'amputa el penis sense extirpar el cos cavernós més proximalment del punt d'amputació. La penectomia radical es realitza quan el tumor infiltra el cos cavernós. Una penectomia total implica la creació d'una uretostomia perineal.

El últims anys s'ha implantat la cirurgia de Möhs pel tractament del CEP, per intentar preservar el màxim de teixit sa, reduint-ne el risc de recidiva.³⁸ Però aquells tumors de mida molt gran o que afectin el cos cavernós, la uretra o el meat uretral, no són tributaris d'aquesta cirurgia.³⁹

Quant ens plantejem el tractament quirúrgic als nostres pacients, hem de tenir en compte aspectes com la localització anatòmica, la funcionalitat de l'òrgan i aspectes psicològics. En general per als tumors petits de baix grau s'intentarà fer tractaments conservadors com la postectomia, la glandectomia o la desepitelització, si pot ser, acompanyades d'estudi microgràfic intraoperatori. Però quan els tumors tingui estadis alts caldrà exèresis més agressives com la penectomia parcial i total.

- Radioteràpia

Es pot usar radioteràpia externa i braquioteràpia. Totes dues són eficaces i evitaren amputacions. Prèviament a l'ús de RDT es recomana fer una postectomia. Per aquells casos irressecables, la radioteràpia sola o

conjuntament amb quimioteràpia pot usar-se com a tractament pal·liatiu. Els efectes secundaris indesitjables de la radioteràpia són la descamació, la mucositis, l'edema subcutani, l'estenosi del meat i la ulceració i la necrosi de la zona. Les taxes de resposta de la radioteràpia als 5 anys són d'entre un 36% i un 66% segons els estudis.⁴⁰

- Quimioteràpia

La quimioteràpia en el CEP es reserva per aquells casos amb la malaltia localment avançada com a part d'un tractament múltiple. La combinació de diversos quimioteràpics s'ha usat quan els ganglis surten positius, amb respostes que van d'un 32 a un 69%.⁴¹ L'aparició de medicaments contra el receptor dels factors de creixement epidèrmics (rFCE) ha suposat una nova arma terapèutica en la lluita contra el CEP, doncs diversos estudis han demostrat una expressió augmentada de rFCE en aquests tumors.^{42,43} Encara hi ha poca experiència dels efectes que tindran aquests nous medicaments en aquesta malaltia però els primers estudis mostren una resposta parcial d'un 25% aproximadament.⁴⁴ La quimioteràpia adjuvant s'ha usat en aquells tumors primaris invasors (T3 o T4) o en els casos d'una important afectació limfàtica engonal (N3) per a reduir la massa tumoral abans de la cirurgia (amb la intenció de realitzar cirurgies més preservadores de l'òrgan).¹⁸ Finalment la quimioteràpia es pot usar com a tractament pal·liatiu, quan els altres tractaments han fracassat. En aquests casos normalment s'aconsegueixen remissions parcials tot i que no augmenta de supervivència.¹⁸

ALTERACIONS MOLECULARS EN EL CARCINOMA DE PENIS

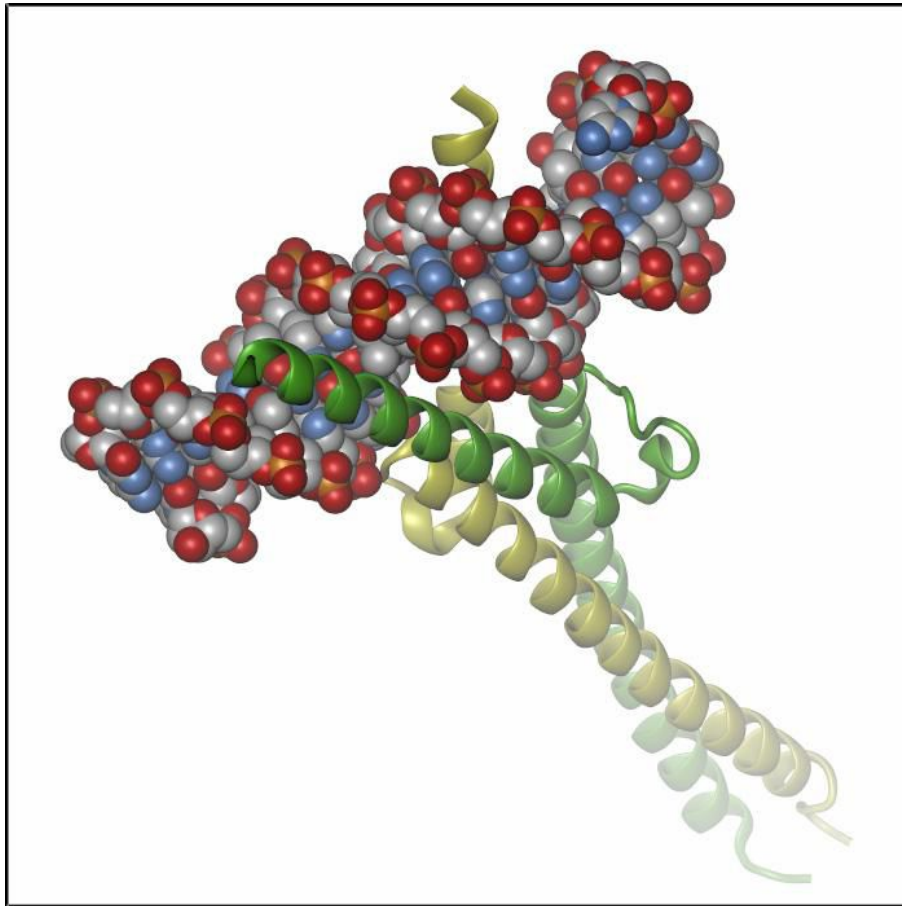
S'han descrit diverses alteracions moleculars implicades en el CEP. S'han descrit alteracions de p16, explicades prèviament, relacionades amb el VPH. Però també hi ha altres alteracions que no depenen del VPH com són: alteracions en la via de mTOR (diana de rapamicina de les cèl·lules de mamífers),⁴⁵ en l'augment en l'expressió de rFCE⁴⁶ i mutacions de p53.²¹ En aquest treball es va decidir estudiar diverses molècules que sospitàvem que també podien estar alterades en el CEP en estar descrites ja prèviament alteracions en aquestes molècules en carcinomes escamosos d'altres localitzacions.^{47,48,49}

MYC

Per estudis d'hibridació genòmica comparada s'ha vist que al CEP és freqüent l'aparició de guanys a les regions 8q24, 16p11-13, 20q11-13, 22q, 19q13 i 5p15 i pèrdues a les regions 13q21-22, 4q21-32 i al cromosoma X. També s'ha descrit que podria haver-hi una correlació entre la presència d'un augment de còpies i un pitjor pronòstic.⁵⁰ A la regió 8q24 trobem el gen *MYC*. *MYC* (*c-MYC*) és un gen regulador que actua com a factor de transcripció, de manera que els nivells d'expressió de Myc es relacionen amb la proliferació cel·lular. S'ha descrit com l'expressió forçada de *MYC* activa el cicle cel·lular així com la seva inactivació atura el cicle cel·lular.⁵¹ Aquesta actuació sobre el cicle cel·lular és mediada per diversos mecanismes que actuen de manera paral·lela.

- En primer lloc la major part dels reguladors positius del cicle cel·lular són codificats per gens induïts per *MYC*. Aquests gens serien les Cdk, ciclines i els factors de transcripció E2F.

- A més a més dels seus efectes directes sobre la transcripció, Myc és capaç d'hiperactivar complexos de ciclina/Cdk a través de la inducció de l'activació de la Cdk cinasa (CAK) i fosfatasa Cdc25.
- D'altra banda, Myc antagonitza l'activitat dels inhibidors del cicle cel·lular com p21 i p27 a través de diferents mecanismes. Així, Myc és capaç de bloquejar la transcripció de p21 o induir Skp2, una proteïna implicada en la degradació de p27.
- Finalment, Myc indueix la replicació de l'ADN mitjançant la unió als punts d'inici de la replicació i per la sobreexpressió de proteïnes necessàries per al inici de la replicació. *MYC* també regula gens implicats en el control de la mitosi.⁵² (Imatge 4).



Imatge 4: Representació tridimensional del gen *MYC* (verd) sobre un promotor d'ADN

Múltiples tumors humans, entre els que també s'inclou el carcinoma escatós de pell i oral, presenten guanys i amplificacions de *MYC*.^{47,48} S'ha vist que aquestes alteracions tenen relació amb l'evolució i el pronòstic. A línies cel·lulars de carcinoma de cèrvix s'ha observat com el VPH s'integra a la regió 8q24,^{53,54} i estudis *in vitro* han demostrat com la inclusió del VPH a aquesta regió portaria a l'activació del gen *MYC*.⁵⁵

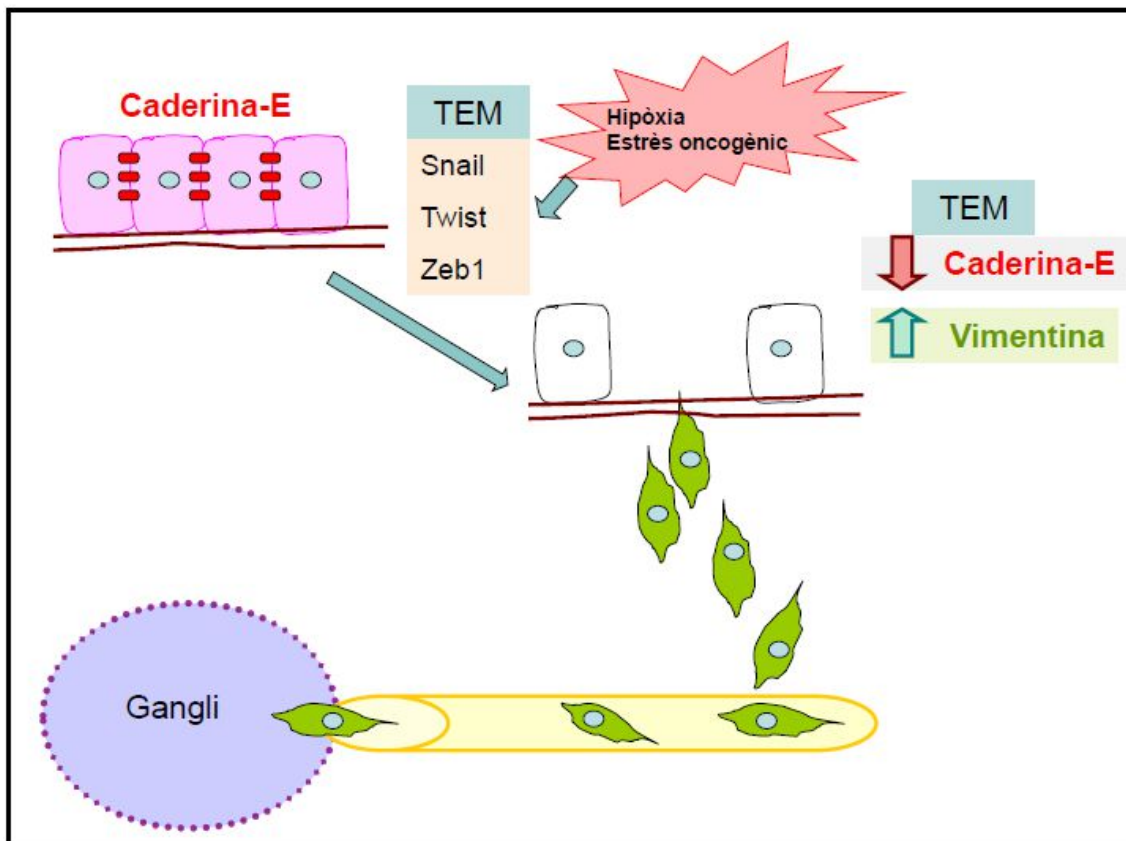
TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA

La transició epiteli-mesènquima (TEM) és un fenomen observat als tumors epitelials que està relacionada amb la pèrdua d'adhesió intercel·lular (pèrdua de Caderina-E de membrana), amb una adquisició d'un fenotip mesenquimal (guany de Vimentina) i amb un augment de la capacitat migratòria de la cèl·lula.⁵⁶ (Imatge 5)

La Caderina-E és una proteïna d'adhesió que forma part dels ancoratges intercel·lulars entre els queratinòcits. La pèrdua d'expressió de la Caderina-E s'associa amb un augment de l'aparició de metàstasis i un pitjor pronòstic en un gran nombre de tumors, entre ells el CEP⁵⁷ i la reexpressió en un tumor n'inhibeix la capacitat d'invasió i de metàstasis.⁵⁸ L'expressió de la Caderina-E pot ser reduïda per l'acció de múltiples repressors de la transcripció relacionats amb la TEM, com són Snail, Twist i Zeb.^{56,58} Aquests factors a més a més promouen l'aparició de marcadors mesenquimals, com la Vimentina.

La Vimentina és un filament de mida intermèdia que s'expressa de forma intensa a les cèl·lules mesenquimals. La seva expressió es relaciona amb l'augment de la capacitat d'invasió i metàstasis.⁵⁹

Finalment cal destacar que el VPH ha estat relacionat amb una desregulació de la Caderina-E de membrana tant en lesions epitelials benignes com en el carcinoma d'amígdala i de cèrvix.^{60,61} Aquesta desregulació no dependria de les proteïnes d'alt risc del VPH.⁶²



Imatge 5: La cèl·lula epitelial (vermella) sotmesa a diversos factors de transcripció (Snail, Twist, Zeb1), perd Caderina-E de membrana i guanya Vimentina, adquirint un fenotip mesenquimal i capacitat migratòria.

TÈCNiques DE LABORATORI REALITZADES

DETECCIÓ DEL VPH

La detecció del VPH es va fer per la tècnica de reacció en cadena de polimerases (RCP). La detecció es va fer sobre els blocs de parafina processant-los sota estrictes mesures d'higiene per evitar contaminacions entre mostres. De cada bloc es realitzaven quatre seccions (mètode del sandwich). El primer i el quart tall s'usaven per a fer una tinció amb hematoxilina-eosina i el segon i el tercer per a detectar el VPH i genotipar-lo. Un bloc de parafina sense mostra era tallat i processat entre cada cas per controlar la presència de

possibles contaminants. La presència del VPH es va detectar per la tècnica de RCP usant els “primers SFP-10” que amplifiquen una regió de 65 pb al gen L1. El producte de la RCP, va ser analitzat en primer lloc usant un còctel de sondes per detectar els 54 tipus de VPH de la mucosa mitjançant tècniques de immunoassaig enzimàtic d’ADN. Les mostres positives van ser posteriorment genotipades per LiPA25 (versió 1, Laboratori Biomedical Products, Rijswijk, Països Baixos)⁶³ per detectar 25 d’alt risc i els VPH de baix risc (6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, i 74).

MICROMATRIUS DE TEIXIT

El 1997, Juhan Kononen i col.⁶⁴ van promulgar la idea de traslladar les micromatrius d’ADN als teixits per a valorar dianes moleculars en diverses mostres de tumors de forma paral·lela. És l’anomenada micromatriu de teixits (TMA). Es tracta de recol·locar teixits des de blocs histològics de parafina convencionals a un bloc final, que contindrà una mostra de cada un dels blocs originals. Els TMAs han estat dissenyats, doncs, per a l’estudi optimitzat del teixit, de manera que ens permet practicar diferents estudis (histologia, detecció proteica per immunohistoquímica, detecció d’ADN per FISH, detecció de RNA per mRNA ISH) sobre les cèl·lules tumorals. La majoria de TMAs es dissenyen sobre teixit parafinat i fixat en formol. Es construeixen a partir de la retirada d’un cilindre de 0,6 a 2 mm de diàmetre del bloc original, que sigui representatiu de l’àrea d’interès del tumor. Mitjançant un aparell d’elaboració de matrius (“*arrayer*”), el cilindre es col·loca en el bloc receptor, el qual permetrà la

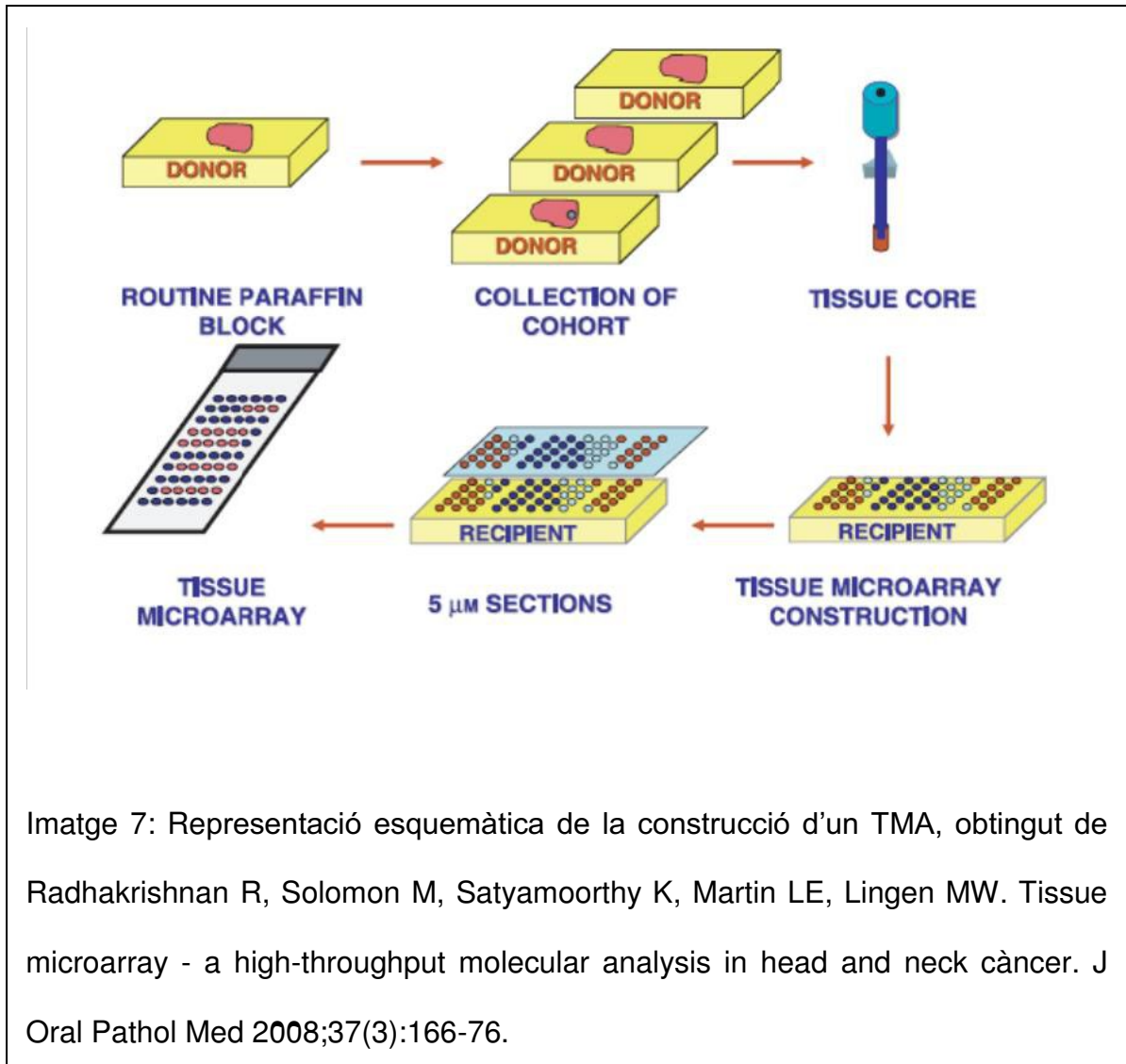
recepció de fins a 1000 cilindres (cal ser molt curós per mantenir l'ordre i localització dels cilindres).

De cada TMA resultant en podem obtenir fins a 300 seccions consecutives de 5 micròmetres de gruix, que permeten realitzar els estudis abans esmentats. Es recomana la pràctica d'una tinció amb hematoxilina eosina d'una lamineta cada 25 seccions per tal de detectar els cilindres que han perdut representació tumoral (Imatge 7).

La principal limitació de la tècnica és el volum tissular, ja que els cilindres tenen una mida de 0,6 a 1 mm, fet que no permet la representació completa del teixit tumoral. Per evitar aquesta limitació s'han utilitzat cilindres més grans, de fins 2 mm de diàmetre. Aquesta tècnica és més adequada quan cal estudiar diferents àrees en un mateix tumor però malmet més el bloc original i permet incorporar menys cilindres en el bloc receptor.

Els TMAs són utilitzats en recerca ja que permeten augmentar la potència estadística dels estudis, optimitzant els recursos i el temps. Per a la clínica habitual i amb una finalitat diagnòstica és millor l'ús de seccions tissulars grans.⁶⁸

La realització d'un TMA és llarga i requereix de la pràctica adequada de tots els passos per evitar la pèrdua de cilindres o la mala selecció del cilindre representatiu del tumor original. Existeixen micromatrius prefabricades i automatitzades que simplifiquen aquesta problemàtica.



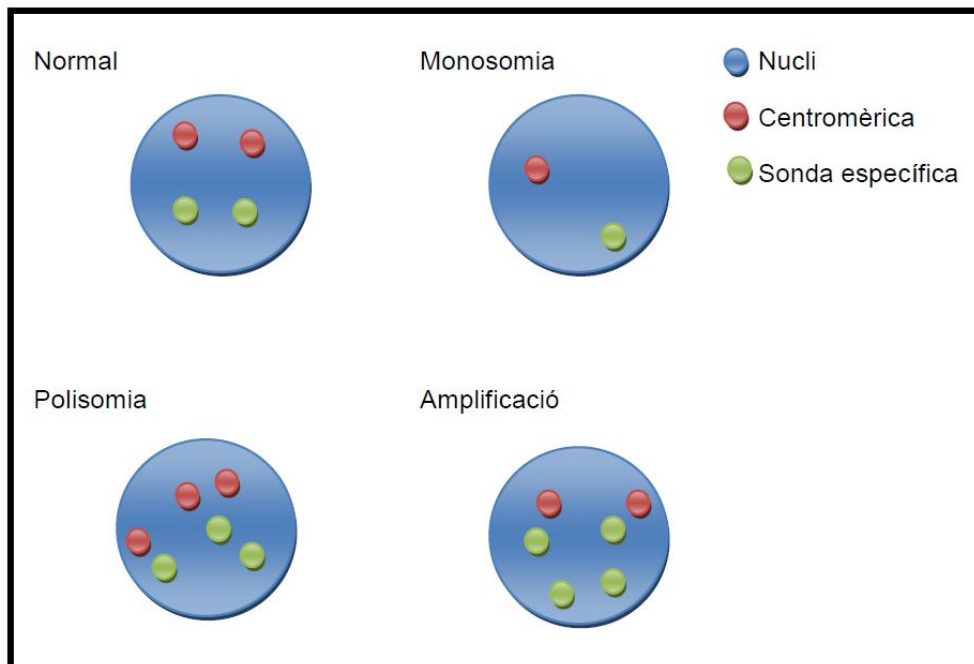
HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH)

La tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) permet la detecció i localització de seqüències específiques d'ADN sobre cromosomes metafàsics o nuclis interfàsics usant sondes específiques marcades. La sonda s'observa en un microscopi de fluorescència.^{66,67,68}

Per aquest estudi s'han usat dos tipus de sondes:

- Sonda centromèrica: formada per seqüències repetitives d'ADN que hibriden amb l'ADN de la regió centromèrica del cromosoma. Aquestes sondes permeten detectar alteracions cromosòmiques. L'ús d'aquest tipus de sondes ens permetrà valorar la presència o absència d'alteracions numèriques, sense necessitat de disposar de cèl·lules en divisió. En aquest estudi s'usa la sonda centromèrica del cromosoma 8.
- Sondes de locus específic: també anomenades de seqüència única, són seqüències d'ADN homòlogues a una regió genòmica corresponent a una banda cromosòmica o a un gen específic. Són molt útils quan es vol estudiar una regió molt concreta del genoma. Les cèl·lules diploides normals mostraran dues còpies de cada seqüència d'ADN (excloent les seqüències dels cromosomes sexuals) fet que permet la detecció d'aberracions numèriques. En el nostre estudi es va usar la sonda específica pel gen *MYC*.

En funció del nombre de còpies de la sonda centromèrica i de l'específica present al nucli de la cèl·lula tindrem: una situació de normalitat (dues de cada), monosomies (presència únicament d'una centromèrica i una sonda específica) amplificacions (presència de dues centromèriques però més de dues sondes específiques) i polisomies (presència de més de dues centromèriques) (imatge 6).



Imatge 6: En funció del nombre de còpies de les sondes centromèriques i específiques ens trobarem en una situació de normalitat, amb una monosomia, una polisomia o una amplificació.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

Les nostres hipòtesis són:

1.- Els CEP presenten aberracions numèriques del gen *MYC* que es podrien correlacionar amb:

1a) El pronòstic de la malaltia.

1b) La presència d'infecció pel VPH.

2.- Els CEP presenten el fenomen de TEM que es podria correlacionar amb:

2a) El pronòstic de la malaltia.

2b) La presència d'infecció pel VPH.

OBJECTIUS

Objectiu genèric:

Identificar biomarcadors amb utilitat com a factors pronòstics en el CEP.

Objectius concrets:

1.- Detectar la presència del VPH i els genotipus en les mostres tumorals i en els casos control.

- 2.- Quantificar per FISH els guanys i amplificacions de *MYC* existents al nucli cel·lulars de la mucosa sana de penis, al CEP *in situ*, al CEP invasor i a les metàstasis.
- 3.- Estudiar l'expressió proteica de c-Myc amb tècniques immunohistoquímiques.
- 4.- Comparar la relació entre el nombre de còpies del gen i l'expressió proteica.
- 5.- Determinar si hi ha relació entre les aberracions / expressió de c-Myc i la infecció pel VPH.
- 6.- Avaluar l'expressió de marcadors de TEM (Caderina-E, Vimentina, Zeb1, Twist i Snail) per tècniques immunohistoquímiques.
- 7.- Comprovar si hi ha alguna relació entre la TEM i la presència del VPH.
- 8.- Determinar si existeix alguna associació entre els marcadors estudiats i les dades clíniques recollides dels malalts (edat, infeccions per VIH, hàbit de fumar, antecedents de malalties inflamatòries prèvies, tractament i evolució) per a poder detectar si tenen alguna implicació en el pronòstic.

RESULTATS

RESULTATS

ARTICLE 1: *MYC* copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. J Urol. 2012 Nov;188(5):1965-71.

Propòsit: Determinar les aberracions numèriques del gen *MYC* i la seva expressió proteica en els diversos estadis del CEP. Relacionar aquestes troballes amb paràmetres clínico-patològics i amb la infecció del VPH.

Material i mètodes: Es van avaluar 79 casos de carcinoma escamós de penis, 11 *in situ* i 68 invasors. El perfil citogenètic de *MYC* va ser avaluat per hibridació *in situ* per fluorescència. La presència del VPH es va detectar mitjançant reacció en cadena de polimerasa.

Resultats: Es van observar guanys de *MYC* a 4 dels 11 carcinomes *in situ* (36%) i a 50 dels 68 invasors (73%). Es va demostrar una associació entre els guanys de *MYC*, la progressió tumoral i el mal pronòstic ($p < 0,05$). En 32 dels 79 casos es va detectar la VPH (39%) sent el VPH-16 el més freqüent. No vàrem trobar cap relació entre els guanys de *MYC* i la presència del VPH però si que es va trobar una associació significativa entre la presència del VPH i la sobreexpressió de *Myc*. Només en els casos en que el VPH era negatiu els guanys de *MYC* es correlacionaven amb la sobreexpressió de *Myc*

Conclusions: Els guanys de *MYC* van augmentant progressivament a mesura que la malaltia progressa des de la fase *in situ* cap a la metàstasi. La presència de guanys de *MYC* és un factor de mal pronòstic independent. Aquestes troballes són independents de la infecció del VPH. L'expressió de

Myc està augmentada en els casos infectats pel VPH possiblement degut a una activació directa per part del virus

MYC Copy Number Gains are Associated with Poor Outcome in Penile Squamous Cell Carcinoma

Emili Masferrer,* Carla Ferrándiz-Pulido, Belén Lloveras, Magalí Masferrer-Niubò, Blanca Espinet, Marta Salido, María Rodríguez-Rivera, Laia Alemany, Jose Placer, Antoni Gelabert, Octavi Servitje, Vicenç García-Patos, Ramon M. Pujol and Agustí Toll

From the Servei de Dermatologia, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (EM), Servei de Dermatologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron (CFP), Universitat Autònoma de Barcelona (EM), Servei d'Anatomia Patològica (BL), Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei d'Anatomia Patològica (BE, MS, MRR) and Servei de Dermatologia, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (RMP, AT), Departament de Matemàtiques, Universitat Politècnica (MMN), Programa de Recerca en Epidemiologia del Càncer, Unitat d'Infeccions i Càncer, Institut Català d'Oncologia (LA) and Servei de Dermatologia, Hospital Universitari de Bellvitge (OS), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Consorcio de Investigación Biomédica de Epidemiología i Salut Pública (LA), Servei d'Urologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron (JP) and Departament d'Urologia, Hospital del Mar (AG), Barcelona, Spain

Purpose: We determined MYC gene numerical aberrations and protein expression at different stages of penile squamous cell carcinoma carcinogenesis. We correlated these findings with clinicopathological parameters and HPV infection. **Materials and Methods:** We evaluated 79 cases of penile squamous cell carcinoma, including 11 in situ and 68 invasive carcinomas. The MYC cytogenetic profile was evaluated by fluorescence in situ hybridization. HPV was detected by polymerase chain reaction amplification.

Results: MYC gains were identified in 4 of 11 in situ carcinomas (36%) and 50 of 68 invasive penile squamous cell carcinomas (73%). A significant association between MYC gains, and tumor progression and poor outcome was demonstrated ($p < 0.05$). HPV DNA was detected in 32 of 79 penile squamous cell carcinomas (39%). High risk type 16 was the most prevalent type. MYC numerical aberrations did not correlate with HPV status. A significant association between HPV and MYC protein over expression was noted. In HPV negative cases MYC gains correlated with MYC over expression.

Conclusions: MYC gains progressively increased during penile squamous cell carcinoma progression from in situ samples to metastases. MYC gains were an independent factor for poor prognosis. These findings were independent of HPV infection. MYC expression was increased in samples with HPV infection, probably reflecting direct activation of MYC.

Key Words: penis; carcinoma, squamous cell; genes, myc; human papillomavirus 16; MYC protein, human

PENILE squamous cell carcinoma is rare in developed countries, representing 0.3% to 0.5% of male malignancies in Europe and in the United States.¹ Risk factors for penile cancer include lack of circumcision during childhood, phimosis and cigarette

smoking.² In contrast to its well demonstrated relevance in cervical cancer,³ the role of HPV in the etiology of penile cancer remains undetermined. The incidence rate of HPV identification varies from 15% to 77.5%^{4,5} depending on detection technique or

Abbreviations and Acronyms

FISH = fluorescence in situ hybridization
IHC = immunohistochemistry
PSCC = penile squamous cell carcinoma

Submitted for publication January 24, 2012.
Study received approval from the ethics committees of Hospital del Mar and Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona.

Supported by Grants PI04/1728, RD09/0076/00036 and PI10/00785 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, FEDER, Spain.

* Correspondence: Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain (telephone: 932483000; FAX: 932483328; e-mail: emilimasferreriniubo@gmail.com).

See Editorial on page 1660.

method, the study population and tumor type. HPV16 is the most prevalent infection in PSCC,⁵ similar to that in other HPV related anogenital cancers.⁶ PSCC may resemble vulvar cancer, which has 2 etiological subsets, including one related to HPV and another not related to this infection.⁷ Interestingly, in a large series of patients a differential HER/PTEN/Akt pathway activation pattern in HPV related vs unrelated PSCC was recently reported.⁸

Comparative genomic hybridization technique in PSCCs demonstrated frequent copy number gains in 8q24, 16p11–12, 20q11–13, 22q, 19q13 and 5p15 with no clear correlation between tumor grade and chromosome aberrations.⁹

MYC is a protooncogene located in the 8q24 chromosome band, encoding a transcription factor with a basic helix-loop-helix leucine zipper protein domain that appears to regulate cellular proliferation, differentiation and apoptosis. In vitro studies indicate that *MYC* is essential for the proliferation of most cell types.¹⁰ It is deregulated and over expressed in most cancer cells.

MYC gains and amplifications have been noted in several human tumor types, including oral and skin squamous cell carcinomas.^{11,12} They seem to have a relevant role in the biological behavior of several carcinomas. Frequent integration of HPV at 8q24 in cervical carcinoma cell lines has also been reported.^{13,14} In vitro studies by Peter et al showed that HPV inclusion in this region may trigger *MYC* activation.¹⁵

We determined *MYC* gene status by FISH and c-myc protein expression by IHC at different stages of PSCC carcinogenesis. We also evaluated a possible correlation of the results with the presence of HPV.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Tissue Samples

We evaluated 88 consecutive samples of PSCC from different patients, dating from 1987 to 2010. According to the standard TNM staging system⁷, neoplasms were stage 0 in 15 cases, stage I in 28, stage II in 27, stage IIIA in 4 and stage IIIB in 7. Stage could not be evaluated in 7 cases. A set of lymph node biopsies showing metastatic spread from 6 PSCCs was also included in the study. Normal skin/mucosa and areas of in situ neoplasm adjacent to the invasive area were obtained, when possible, from stage I to III tumors (invasive PSCCs).

Normal skin/mucosa and in situ samples adjacent to stage 0 tumors were obtained, when possible. A control group consisting of 16 samples of normal foreskin from children with phimosis was also evaluated.

All human samples used in this study were archival material obtained without written consent from the cellular pathology department registry at 2 tertiary centers (Hospital del Mar and Hospital de la Vall d'Hebron, Bar-

celona). Approval to perform this study was obtained from the ethics committees at the 2 participating centers. The study was done in accordance with the Guidelines of the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

Clinicopathological Features

A set of selected clinicopathological parameters was evaluated, including stage (0, I, II or III), tumor volume, histopathological tumor differentiation (well, moderate, poorly differentiated or undifferentiated), patient age, clinical evolution (recurrent disease) and outcome.

Human Papillomavirus

HPV detection and typing were performed as part of an ongoing international study. Briefly, paraffin embedded specimens were obtained from PSCC cases. Paraffin blocks were processed under strict conditions to avoid contamination. Four paraffin sections per block were systematically obtained using the sandwich method. The first and fourth sections were used for histopathological assessment after hematoxylin and eosin staining, and the second and third sections were used for HPV DNA detection and genotyping. A blank paraffin section was cut and processed between specimens to control for any carryover contamination, in addition to routine controls. The presence of HPV DNA was determined by polymerase chain reaction based on SPF-10 primers that amplify a 65 bp region in the L1 gene. Polymerase chain reaction products were first analyzed using a cocktail of conservative probes to detect at least 54 mucosal HPV types by DNA enzyme immunoassay. Positive samples were subsequently genotyped by LiPA25, version 1 (Laboratory Bio-Medical Products, Rijswijk, The Netherlands)¹⁶ to detect 25 high and low risk HPVs, including 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70 and 74.

Tissue Microarrays

Ten tissue microarrays were constructed, as outlined by Kononen et al.¹⁷ A hematoxylin and eosin stained section was obtained from each block to define representative unaltered regions, in situ squamous cell carcinoma regions, invasive tumor areas and metastatic areas. Two tissue cylinders with a diameter of 2 mm were punched from the selected areas from each tissue block and brought into a recipient paraffin block using a tissue microarrayer (Advanced Tissue Arrayer, Arrayer Punch set 2.00 mm, ATA200, Chemicon®).

Fluorescence in Situ Hybridization

To assess *MYC* genetic status we used the LSI *MYC/IGH*, CEP8 tricolor dual fusion probe (Abbott Molecular, Abbot Park, Illinois). It contains 3 probes, including a centromeric satellite specific for chromosome 8 (SpectrumAqua™), a locus specific probe from the *MYC* gene located at 8q24 (SpectrumOrange™) and a locus specific probe from the *IGH* gene located at 14q32 (SpectrumGreen™).

Results were analyzed in a BX51 fluorescence microscope (Olympus®) using CytoVision®. Tissue sections were scanned at low magnification (100×) with 4,6-diamidino-2-phenylindole excitation to localize areas for which histopathological characteristics had been established by examination of a hematoxylin and eosin stained

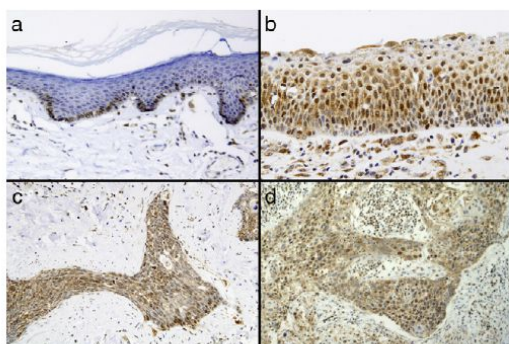


Figure 1. Immunohistochemistry of c-myc. *a*, normal foreskin shows c-myc positivity in 100% of basal keratinocytes but is negative for suprabasal keratinocytes. *b*, in situ PSCC demonstrates positivity in basal and suprabasal keratinocytes. *c*, C-myc over expression in invasive PSCC. *d*, C-myc over expression in PSCC metastatic sample. Reduced from $\times 200$.

tissue section. For amplification or polysomy evaluation 100 nonoverlapping nuclei per sample were analyzed.

A total of 16 normal foreskin samples from healthy donors served as negative controls. These samples were hybridized with the same probe to establish cutoff values, which were calculated as the mean of positive findings plus $3 \times SD$.

We established criteria for the definition of *MYC* copy number aberrations. Gene gains were considered by amplification or polysomy. *MYC* amplification was calculated as the average ratio of *MYC* gene signals to CEP8 signals per cell. *MYC* gene amplification was considered when the ratio was greater than 2, or when we detected innumerable loose or tight gene clusters in more than 10% of tumor cells.¹⁸ Polysomy 8 was considered when the cells had more than 2 copies of the centromeric probe from chromosome 8 with a *MYC*/CEP8 ratio of less than 2 (between 0.5 and 1).

Immunohistochemistry

IHC study was performed using the Autostainer Plus Link (Dako, Glostrup, Denmark) according to previously established protocols. IHC staining was developed for Myc (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). IHC staining was scored by 2 independent observers (EM and BL).

Protein expression was quantified as the percent of keratinocytes showing positivity (range 0% to 100%). In human epidermis, MYC protein is predominantly expressed in the nucleus of basal cell keratinocytes. Normal foreskin showed MYC positivity in 100% of basal keratinocytes and in 0% of suprabasal keratinocytes (fig. 1, *a*). Staining in 10% or greater of suprabasal cells was considered positive (over expression) for in situ PSCC (fig. 1, *b*). Over expression in PSCC and metastasis was also considered when 10% or greater of tumor cells showed positivity (fig. 1, *c* and *d*).

Statistical Analysis

The correlation between variables was evaluated using the Pearson correlation coefficient. The relationship between variables was evaluated using the chi-square and Student *t* tests as estimators, as appropriate. Analysis was done with LibreOffice® 3.3.

Specific mortality rates were estimated with the Kaplan-Meier method from the day of the histopathological diagnosis of PSCC. Analysis was performed with SPSS® 15.0. Significance was considered at $p < 0.05$.

RESULTS

Of 88 PSCCs 79, including 11 in situ and 68 invasive PSCCs, and 5 metastases, could be finally evaluated due to technical limitations, including loss of tissue microarray cylinders or fewer than 100 cells per tumor showing a *MYC* signal by FISH. A total of 46 normal mucosa samples and 53 in situ lesions adjacent to invasive tumors could be evaluated. Seven normal mucosa samples adjacent to in situ PSCC could also be assessed.

Clinical Features

Mean age of patients with PSCC was 68 years (range 25 to 96). Disease was classified as stage 0 (TisN0M0) in 11 patients, stage I (T1aN0M0) in 26, stage II in 27 (T1bN0M0 in 5, T2N0M0 in 12 and T3N0M0 in 10), stage IIIA in 4 (T1N1M0 in 1, T2N1M0 in 2 and T3N1M0 in 1) and stage IIIB in 7 (T1N2M0 in 1, T2N2M0 in 1 and T3N2M0 in 5). Stage could not be evaluated in 4 invasive samples. Inguinal lymph node metastases developed in 11 patients and 8 died of PSCC progression. Recurrence developed in 14 patients. Table 1 shows the recurrence rate according to treatment method. Median followup was 44 months (range 1 to 180).

Histopathological and IHC Features

The most frequent tumor histopathological type was squamous cell carcinoma of the usual type (61%). Disease was well, moderately and poorly differentiated in 25, 21 and 20 cases, respectively, and undifferentiated in 2. Table 2 lists MYC IHC results.

HPV Status

HPV DNA could be evaluated in 79 PSCCs and in all control samples. HPV DNA was not detected in 16

Table 1. Recurrence rate by therapeutic modality

	No. Pts/No. Recurrence (%)
Penectomy:	
Total	7/3 (42.8)
Partial	45/6 (13.3)
Glandectomy	5/1 (20)
Circumcision	7/0
Simple excision	9/2 (22)
Simple graft	1/0
Medical	4/2 (50)

Table 2. MYC immunohistochemical over expression in penile samples

	No. Over Expression (%) [*]	No. Normal (%) [†]
Suprabasal:		
Perilesional mucosa	9 (21)	33 (79)
In situ Ca adjacent to invasive PSCC	21 (41)	30 (59)
Invasive Ca	26 (61)	16 (39)
Metastasis	2 (40)	3 (60)
Total No.	58	82

* Greater than 10% of cells.

† Less than 10% of cells.

normal foreskin samples. HPV DNA was detected in 32 of 79 PSCCs (39%). Of 32 HPV positive tumors 29 (90.6%) showed a single HPV subtype and 2 of 32 (6.25%) harbored multiple HPV types (up to 6 low and high risk HPV types). High risk type 16 was the most prevalent one, present in 25 of 32 HPV positive lesions (78%). HPV18 was not detected in any sample (table 3).

FISH Results

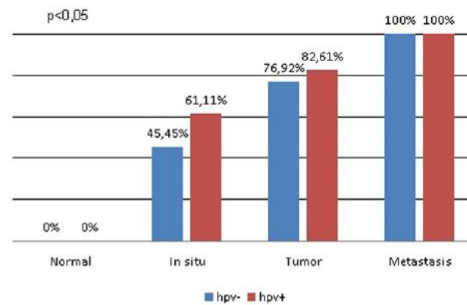
The 16 normal foreskin samples and 53 nonlesion samples obtained from pathological cases showed no MYC copy number changes. MYC numerical aberrations were identified in 4 of 11 in situ carcinomas (36.4%). Also, 25 in situ carcinomas adjacent to a total of 49 invasive PSCCs with MYC gains (51%) harbored MYC gains. No MYC numerical aberrations were identified in in situ carcinomas adjacent to invasive PSCCs that showed no MYC gain. No statistical differences in MYC gains were found between in situ carcinomas alone and in situ carcinomas adjacent to invasive PSCC.

Of 68 invasive PSCCs 49 (72%) showed MYC gains. The percent of cells with MYC aberrations was lower in areas of in situ carcinoma adjacent to invasive PSCC than in invasive PSCC samples (mean 19% vs 42%, $p < 0.05$, fig. 2).

MYC polysomies were observed in 1 of the 11 in situ samples (9%). Polysomies were also observed in 9 of 53 samples (16%) of in situ carcinoma adjacent

Table 3. HPV types in current PSCC series

HPV Type	No. Cases
16	23
33	2
16/45	1
16/6	1
58	2
74	1
6	1
Unidentifiable	1
Total No.	32



	Normal		In situ		Tumour		Metastasis	
	Gains	Total	Gains	Total	Gains	Total	Gains	Total
HPV-	0	30	15	33	30	39	4	4
HPV+	0	18	11	18	19	23	1	1

Figure 2. Note significant increase in MYC gains in disease progression. No MYC differences were found between HPV and nonHPV cases.

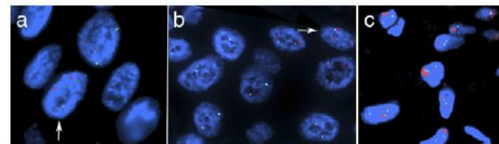
to invasive PSCC and in 30 of 53 invasive PSCCs (56%) ($p < 0.05$, fig. 3, a).

No MYC amplifications were detected in the group of in situ neoplasms. In contrast, 6 of 46 in situ carcinomas (13.6%) adjacent to invasive PSCC showed MYC amplifications. MYC amplifications were observed in 26 of 68 invasive PSCCs (38%) (fig. 3, b).

All 5 metastatic samples showed numerical aberrations, polysomies and amplifications (86%, 79% and 57%, respectively). We detected cluster-type MYC amplification in 5 PSCCs (fig. 3, c).

Correlations with MYC Numerical Aberrations

MYC expression. No association was observed between MYC numerical aberrations and MYC over expression by IHC. However, a significant association between MYC gains and protein over expression was detected when HPV positive tumors were excluded ($p < 0.05$).

**Figure 3.** FISH demonstrates distinct types of MYC copy number changes using MYC SpectrumOrange/CEP8 SpectrumAqua probe. a, representative example shows polysomy (arrow). FISH revealed 3 copies of 2 signals. b, amplification (arrow). FISH detected cells with multiple copies of MYC gene with MYC/CEP8 signal ratio greater than 2. c, nuclei show MYC clusters with innumerable copies of MYC gene.

MYC over expression and clinicopathological features. No association was observed between *MYC* numerical aberrations or *MYC* over expression and certain clinicopathological parameters, that is patient age and tumor volume. None of the 4 patients with in situ carcinoma and *MYC* numerical aberrations showed progression to invasive carcinoma regardless of the use of medical or surgical methods. Cases that had evolved to metastasis showed more *MYC* numerical aberrations than nonmetastatic PSCC cases (60% vs 31%, $p < 0.05$).

Kaplan-Meier survival analysis revealed that poor outcome (mortality, node metastasis and/or recurrence) was significantly increased in patients with *MYC* numerical aberrations in more than 30% of tumor cells (fig. 4).

We observed an increase in *MYC* gains, paralleling the progression of histopathological tumor differentiation (well, moderately, poorly differentiated or undifferentiated) ($p < 0.01$). However, no significant association between *MYC* over expression and tumor differentiation was observed.

A significant association between *MYC* gains and tumor progression (stage I, II and III) was also detected ($p < 0.05$). Although a trend toward increased *MYC* expression by IHC with tumor progression was noted, this did not attain significance.

Three of 5 samples showing cluster-type *MYC* amplification were metastatic, while the other 2 corresponded to patients with disease associated death.

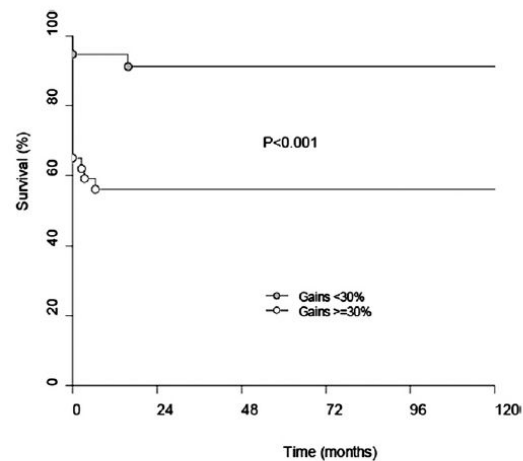


Figure 4. Kaplan-Meier analysis shows that *MYC* gains (more than 30% of nuclei with more than 2 copies) were significantly associated with poor outcome, such as mortality, node metastasis and/or recurrence (local recurrence in patients treated only with imiquimod 5% with 2 patients excluded from analysis).

MYC over expression and HPV status. No association was observed between the presence of HPV infection, and *MYC* gains and/or amplification (fig. 2). In contrast, the presence of HPV correlated significantly with *MYC* over expression ($p < 0.025$).

DISCUSSION

PSCC tumorigenesis is a multistep process characterized by the accumulation of chromosome alterations and several aberrant genetic events. Gene gains and amplifications are common alterations in many cancers, resulting in extra copies of regions that contain growth promoting oncogenes and leading to gene over expression, which confers a growth advantage. Few groups have addressed cytogenetic aberrations in PSCCs. A recent study by Stankiewicz et al demonstrated that copy number gains in *EGFR*, a gene commonly involved in cancer development, are rare in PSCCs.⁸ In contrast, the gain of the 8q24 chromosomal band containing *MYC* is a recurrent finding in PSCC.⁹ We focused on the detection of *MYC* aberrations in all stages of PSCC.

No significant differences in *MYC* gains were observed between penile in situ carcinoma and in situ carcinoma adjacent to invasive PSCC. However, *MYC* amplifications were only detected in in situ samples accompanying invasive PSCC. These findings suggest that detecting *MYC* amplifications may be related to a risk of PSCC invasiveness. However, the low sensitivity of this parameter makes it useless in the clinical setting.

Our study revealed an increase in *MYC* numerical aberrations, paralleling the progression of PSCC from in situ carcinoma to metastasis. In light of previous data reported by our group,^{11,12} significantly increased *MYC* copy number gains seem to be shared with oral and cutaneous squamous cell carcinomas. These findings suggest that squamous cell carcinoma at different locations may develop via similar molecular pathways that drive to *MYC* numerical aberrations.

In addition, we observed a significant increase in *MYC* gains in poorly differentiated PSCC and at advanced stages. These findings were also previously observed by our group in cutaneous squamous cell carcinoma.¹¹ They highly suggest that *MYC* may promote loss of differentiation and be considered a progressor gene.

Interestingly, we noted that high copy numbers of *MYC* were significantly associated with poor outcome (mortality, node metastasis and/or recurrence) in PSCC. Previous studies showed an association between *MYC* gene gains, and high histological grade, lymph node metastases and/or poor survival in breast and colon cancers, osteosarcoma and laryngeal squamous cell carcinoma.^{19–23} Numerical aber-

rations in other genes, such as *EGFR* in lung carcinoma²⁴ or *ERBB2* in breast carcinoma,²⁵ are also associated with poor outcome and correlate with the treatment response to anti-*EGFR*/anti-*ERBB2* drugs. Omomyc is a promising *MYC* interfering molecule that has demonstrated therapeutic efficacy with little toxicity in transgenic mouse cancer models in vivo.^{26,27} The future role of drugs such as Omomyc in the management of squamous cell carcinoma, including PSCC, with *MYC* gains and/or *c-myc* over expression merits further studies.

A causal relationship between HPV and most cervical carcinomas is well established.²⁸ However, other etiologies must have a role in PSCC since HPV is not always detected in these tumors.¹ In our study approximately 40% of the samples harbored HPV infection, equaling previously reported numbers.³ We observed no cases of HPV18 positive PSCC, probably reflecting a low incidence of this HPV type in the Mediterranean area, as previously reported.²⁹

HPV status did not correlate with the presence of *MYC* gains. This agrees with the frequent observation of *MYC* gains in cutaneous squamous cell carcinoma,¹¹ which is not commonly related to group α HPV infection. However, *MYC* immunohistochemical expression was increased in samples with HPV infection, as previously reported for cervical neoplasms.³⁰ The relevance of this correlation may also be inferred from the observation of a switch to a significant association between *MYC* gains and *MYC* over expression when HPV positive samples were excluded from analysis. Briefly, all of these

data would favor the hypothesis of direct activation of *MYC* by HPV.¹⁵

Our study had some limitations that should be noted. 1) There were the inherent biases and potential errors of a retrospective study. Also, although some patients were followed for a long period, a 5-year followup could not be achieved in all. 2) We could not study all patients due to loss of tissue microarray cylinders or the lack of 100 nuclei per evaluated sample. 3) IHC and FISH were performed in 2 mm cylinders, which could provide nonrepresentative results in tumors with heterogeneous areas.

CONCLUSIONS

We observed that *MYC* gains progressively increased during tumor progression from in situ samples to metastases in PSCC cases. These findings seemed to be independent of HPV infection. Conversely, *c-myc* expression was increased in samples with HPV infection, which may reflect the integration of this virus with consequent direct activation of *MYC* and the existence of 2 types of PSCC. *MYC* gains are an independent factor for poor prognosis.

ACKNOWLEDGMENTS

Tania Lobato assisted with tissue microarray construction. F. Xavier Bosch, Silvia de Sanjosé and JoEllen Klaustermeier, RIS HPV TT and HPV VVAPO study groups, Institut Català, assisted with the study. HPV detection and typing were done at Institut Català d'Oncologia.

REFERENCES

1. Stankiewicz E, Prowse DM, Ktori E et al: The retinoblastoma protein/p16 INK4A pathway but not p53 is disrupted by human papillomavirus in penile squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2011; **58**: 433.
2. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG et al: Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer* 2005; **116**: 606.
3. Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ et al: Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol* 2009; **27**: 141.
4. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S et al: Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer* 2006; **119**: 1078.
5. Pascual A, Pariente M, Godinez JM et al: High prevalence of human papillomavirus 16 in penile carcinoma. *Histol Histopathol* 2007; **22**: 177.
6. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC et al: Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2009; **124**: 1626.
7. Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA et al: Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* 1996; **87**: 59.
8. Stankiewicz E, Prowse DM, Ng M et al: Alternative HER/P16/Akt pathway activation in HPV positive and negative penile carcinomas. *PLoS One* 2011; **6**: e17517.
9. Alves G, Heller A, Fiedler W et al: Genetic imbalances in 26 cases of penile squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; **31**: 48.
10. Pelengaris S, Littlewood T, Khan M et al: Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 1999; **3**: 565.
11. Toll A, Salgado R, Yébenes M et al: *MYC* gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2009; **161**: 1112.
12. Martin-Ezquerro G, Salgado R, Toll A et al: Multiple genetic copy number alterations in oral squamous cell carcinoma: study of *MYC*, *TP53*, *CCND1*, *EGFR* and *ERBB2* status in primary and metastatic tumours. *Br J Dermatol* 2010; **163**: 1028.
13. Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H et al: Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 1999; **59**: 141.
14. Brink AA, Wiegant JC, Suzhai K et al: Simultaneous mapping of human papillomavirus integration sites and molecular karyotyping in short-term cultures of cervical carcinomas by using 49-color combined binary ratio labeling fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; **134**: 145.
15. Peter M, Rosty C, Couturier J et al: *MYC* activation associated with the integration of HPV DNA

- at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 2006; **25**: 5985.
16. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L et al: Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 2508.
17. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; **4**: 844.
18. Varela-Garcia M: Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol* 2006; **1**: 19.
19. Dang CV: c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1.
20. Liao DJ and Dickson RB: c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000; **7**: 143.
21. Deming SL, Nass SJ, Dickson RB et al: C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 2000; **83**: 1688.
22. Joensuu K, Hagström J, Leidenius M et al: Bmi-1, c-myc, and Snail expression in primary breast cancers and their metastases—elevated Bmi-1 expression in late breast cancer relapses. *Virchows Arch* 2011; **459**: 31.
23. Wu X, Cai ZD, Lou LM et al: Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol* 2012; **36**: 212.
24. Berardi R, Santinelli A, Brunelli A et al: Epidermal growth factor receptor status in stages of resected non-small cell lung cancer: implications for treatment with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Anal Quant Cytol Histol* 2011; **33**: 196.
25. Sircoulomb F, Bekhouche I, Finetti P et al: Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer* 2010; **10**: 539.
26. Soucek L, Nasi S and Evan GI: Omomyc expression in skin prevents Myc-induced papillomatosis. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 1038.
27. Savino M, Annibali D, Carucci N et al: The action mechanism of the Myc inhibitor termed Omomyc may give clues on how to target Myc for cancer therapy. *PLoS One* 2011; **6**: e22284.
28. Faridi R, Zahra A, Khan K et al: Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology* 2011; **8**: 269.
29. Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S et al: Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer* 2008; **122**: 132.
30. Samir R, Asplund A, Tot T et al: High-risk HPV infection and CIN grade correlates to the expression of c-myc, CD4+, FHIT, E-cadherin, Ki-67, and p16INK4a. *J Low Genit Tract Dis* 2011; **15**: 280.

ARTICLE 2: Epithelial to mesenchymal transition in penile squamous cell carcinoma. J Urol. 2015

Propòsit: La transició epitel·li mesènquima (TEM) és un fenomen observat als tumors epitel·lials que provoca una pèrdua de l'adhesió intercel·lular, l'adquisició d'un fenotip mesenquimal i un augment de la capacitat migratòria. Mentre que s'han realitzat molts estudis entre la relació de la TEM i el risc de metastàsis i de progressió tumoral als carcinomes escatosos, hi ha molt pocs estudis del fenomen de TEM en aquells carcinomes escatosos relacionats amb els virus del papil·loma humà (VPH) d'alt risc. A més a més, no ha estat investigat si el fenomen de TEM al carcinoma escatós de penis (CEP) està activat pel VPH o és independent de la infecció del virus. L'objectiu d'aquest estudi és avaluar la presència de marcadors de TEM i la seva relació amb el VPH al CEP.

Material i mètodes: Es va estudiar, per immunohistoquímica, l'expressió de Caderina-E, Vimentina i els factors de transcripció relacionats amb la TEM Twist, Zeb 1 i Snail en una sèrie de 64 CEPs. Mitjançant PCR es va determinar la presència del VPH als CEPs.

Resultats: La pèrdua de l'expressió de Caderina-E de membrana simultàniament a la sobreexpressió de Vimentina es va observar en un 43.5% dels CEP. El VPH es va associar amb la pèrdua de Caderina-E però no amb la TEM. Els casos que presenten TEM tenen major risc de recurrència i més mortalitat.

Conclusions: Les nostres troballes indiquen que, al CEP, la TEM s'associa amb un pitjor pronòstic però no amb la presència del VPH.

EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN PENILE SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Emili Masferrer¹, Carla Ferrándiz-Pulido², Magalí Masferrer-Niubò³, Alfredo Rodríguez-Rodríguez⁴, Inmaculada Gil⁵, Antoni Pont⁶, Octavi Servitje⁷, Antonio García de Herreros⁸, Belen Lloveras⁹, Vicenç García-Patos², Ramon M Pujol¹⁰, Agustí Toll^{10*}, Inmaculada Hernández-Muñoz^{8*}.

1 Department of Dermatology. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Hospital del Mar. Parc de Salut Mar. IMIM. Universitat Pompeu Fabra.

2 Department of Dermatology. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.

3 Department of Mathematics. Universidad Nacional de Educación a Distancia UNED.

4 Department of Urology. Hospital del Mar. Parc de Salut Mar. IMIM.

5 Department of Dermatology. Hospital Universitari St. Joan de Reus-Universitat Rovira i Virgili de Tarragona.

6 Department of Urology. Hospital Universitari St. Joan de Reus-Universitat Rovira i Virgili de Tarragona.

7 Department of Dermatology. Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL

8 IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), Barcelona.

9 Department of Pathology. Hospital del Mar. Parc de Salut Mar.

10 Department of Dermatology. Hospital del Mar. Parc de Salut Mar.

*I.H-M. and A.T. contributed equally to this work.

Corresponding author:

Emili Masferrer

Department of Dermatology

Hospital del Mar

Pg/ Maritim 25-29.

Barcelona 08003

Tel: 932483000

Fax: 932483328

e-mail: emilimasferreriniubo@gmail.com

Running title: EMT in PSCC

Key words: Penile squamous cell carcinoma, epithelial to mesenchymal transition, E-cadherin, Vimentin, Human Papillomavirus

Funding:

This study was partially supported by the grants PI04/1728, RD09/0076/00036, PS09/00973 and PI10/00785 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, FEDER, Spain, and from the AGAUR (2009 SGR 1409).

Conflict of Interest Disclosure: None declared

Word count: 2695

Number of figures: 2

Number of tables: 2

Number of references: 29

Abstract

Purpose: The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon observed in epithelial tumors that involves loss of intercellular adhesion, mesenchymal phenotype acquisition and enhanced migratory potential. Whereas the EMT process has been extensively linked to the metastatic progression of the squamous cell carcinoma (SCC), studies on the role of EMT in SCC containing high-risk human papillomaviruses are scarce. Moreover, EMT involvement in human penile squamous cell carcinoma (PSCC), that can arise either through transforming HPV infections or independent to HPV, has not been investigated. The aim of the present study was to evaluate the presence of EMT markers and its relationship to HPV in PSCCs.

Material and methods: Expression of E-cadherin, Vimentin and the EMT-related transcription factors Twist, Zeb1 and Snail was assessed by immunohistochemical staining in a series of 64 PSCCs. HPV was detected by PCR amplification.

Results: Simultaneous loss of membranous E-cadherin expression and Vimentin overexpression was shown in 43.5% of PSCCs cases. HPV was significantly associated with loss of membranous E-cadherin but not with EMT. Recurrence and mortality was significantly higher among those cases showing EMT.

Conclusions: Our findings indicate that in PSCC, EMT is associated with poor prognosis but not with the presence of HPV.

1. Introduction

Penile squamous cell carcinoma is a rare tumor most commonly affecting men between the ages 65 to 74 years. In Europe and the United States, it represents 0.3–0.5% of male malignancies. PSCC may histologically be divided into usual type (70%–90%), basaloid (10%) and low-grade verruciform tumors that include verrucous, warty and papillary carcinomas. Rare variants include an aggressive sarcomatoid subtype and mixed tumors of usual type and another variant.¹ Risk factors for penile cancer include lack of circumcision during childhood, phimosis, cigarette smoking and human papillomavirus infection.² A bimodal etiopathogenic pathway in the carcinogenesis of PSCC has recently been proposed, one related to high-risk HPV infection and another HPV independent.³ The rate of HPV identification in PSCC varies from 15% to 77.5% depending on the technique used, the population being studied and/or the subtype.⁴ The high-risk HPV16 is, by far, the most frequently detected genotype in PSCC. In contrast to cervical cancer, in which HPV is found in 100% of the cases, HPV-related lesions are more frequent in some subsets of PSCC, such as basaloid and warty subtypes.⁵ HPV products E6 and E7 play crucial roles in carcinogenesis by targeting tumor suppressor p53 and Retinoblastoma proteins, respectively. In addition, HPV has also been associated with surface E-cadherin deregulation in benign epithelial lesions, tonsillar carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia.^{6,7} This

association seems to be independent of the activities of high-risk HPV proteins on cell cycle regulators.⁸

In many epithelial tumors the escape of cancer cells from the primary tumor is often associated not only with loss of intercellular adhesion and but also with concomitant enhanced migratory potential, collectively termed *epithelial to mesenchymal transition*.⁹ E-cadherin is the main component of the adhesion molecules that mediate anchoring intercellular junctions between keratinocytes. Loss of E-cadherin expression correlates with an increased metastatic potential and poor prognosis in a broad number of tumors, including PSCC,^{10,11} while E-cadherin re-expression in tumor cells inhibits invasion and metastasis.¹² E-cadherin expression can be downregulated by the action of several EMT-associated transcription repressors, such as members of the Snail, Twist and Zeb families.^{9,12} These factors can also promote the gain of mesenchymal markers, such as Vimentin, an intermediate-sized filament highly expressed in mesenchymal cells commonly used to identify epithelial cancer cells undergoing EMT and whose expression correlates with an increased invasiveness and metastatic spread.¹³

PSCCs display a high capacity to invade and metastasize, and regional spread occurs from inguinal nodes to pelvic lymph nodes. Despite being a highly metastatic pathology, the EMT phenomenon has not been previously explored in these tumors. In the present study we aimed to analyze the expression of EMT immunohistochemical markers in a series of PSCCs, to evaluate their

possible association with the presence of HPV and to investigate their potential value as a prognostic factor.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissue samples

Seventy-three consecutive samples of PSCC from different patients, dating from 1987 to 2010, were included in the study. Samples were retrieved from the Departments of Pathology of two tertiary centers (Hospital del Mar and Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona).

Approval to conduct this study was obtained from the ethics committees from both centers participating in the study, in accordance with the Guidelines of the Helsinki Declaration of 1975 revised in 1983.

2.2. Clinicopathological features

The following clinicopathological parameters were evaluated: stage, according to the standard penile TNM staging system 7, ¹⁴ tumor volume (calculated, in mm³, from fresh sample using three measures: longitudinal diameter, vertical diameter and depth), histopathological tumor differentiation (well, moderate, poorly differentiated), histopathological tumor subtype (verrucous, warty, usual type, basaloid, and sarcomatoid carcinoma, as well as mixed tumors of usual type and another variant), age at diagnosis, follow-up, development of

recurrences (PSCC reappearance after treatment in the primary site), mortality and lymph node metastases.

2.3. Human papillomavirus

HPV detection and typification was performed as part of an ongoing international study, as previously described by our group for this series.⁵ In brief, HPV DNA presence was detected by PCR. PCR products were then analyzed to detect at least 54 mucosal HPV types by DNA enzyme immunoassay and positive samples were subsequently genotyped to detect 25 high and low risk HPVs. Fifteen samples of normal foreskin from children with phimosis were used as negative control.⁵

2.4. Tissue microarrays

Ten TMAs were constructed as outlined by Kononen and colleagues.¹⁵ First, hematoxylin–eosin stained sections were obtained from each block to define representative regions. Two tissue cylinders were punched from the selected areas from each tissue block and brought into a recipient paraffin block using the tissue microarrayer (Arrayer Punch set 2.00mm. ATA200. Advanced Tissue Arrayer. Chemicon International). TMAs also included 15 human epidermal foreskins derived from healthy children that were used as non-tumoral tissue controls.

2.5. Immunohistochemistry

In order to assess the representativity of the TMA cylinders, E-cadherin was evaluated in all cases, from both paraffin-embedded complete tissue block

sections and microarray sections. A high degree of correlation between E-cadherin expression in the whole sample and in TMA cylinders was observed (Kappa coefficient = 0.93, $P < 0.001$). In addition, Vimentin expression was also evaluated in nine whole samples included in the TMAs. As indicated for E-cadherin expression, Vimentin expression in the TMA tissue perfectly reflects the expression of this marker in the whole sample. Immunostainings to detect other EMT-related proteins were only performed in TMA samples. For E-cadherin, Vimentin, Twist and Zeb1 immunodetection, sections were processed as described before.¹⁶ Antibodies to detect these proteins were: anti-E-cadherin (BD Transduction Laboratories); anti-Vimentin (Novocastra); anti-Zeb1 (Sigma); Twist2C1a (Abcam); Snail1 as previously described.¹⁶ IHC staining was scored by two independent observers (E.M. and I.H-M).

Loss of membranous E-cadherin was considered when less than 90% of the tumor area retained its expression. Since E-cadherin antibody recognizes the intracellular domain of the protein, subcellular location (membrane, cytoplasm or nucleus) of E-cadherin was also registered. Vimentin expression was considered positive when more than 10% of the tumor cells showed cytoplasmic positivity. Simultaneous loss of membranous E-cadherin expression and Vimentin over-expression was considered to correspond to EMT. Zeb1, Twist and Snail expression were considered positive when more than 10% of the nuclei showed any degree of signal. All these cut-off values were chosen considering normal expression in non-tumoral samples.

2.6. Statistical analysis

Descriptive analyses of clinical, clinicopathological and immunohistochemical data were carried out. Association between EMT markers and clinicopathological variables was analyzed with the chi-square test. Specific mortality rates were estimated with the Kaplan-Meier method and proportional hazards regression model adjusted for grade and stage from the day of histopathological diagnosis. P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed with Libre Office 3.3 and SPSS 19.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Clinical and clinicopathological features

Due to technical limitations (TMA cylinders loss) sixty-four out of seventy-three PSCC samples were finally evaluated. Mean age of the PSCC patients was 68 years (range 41–96 years). Mean tumor volume was 17,880 mm³ (range 300 - 111,360 mm³). Twenty-nine cases were classified as having stage I (T1aN0M0) disease, thirteen stage II (11 T2N0M0; 2 T2N1M0) and eighteen stage III (1 T1N2M0; 1 T2N2M0; 9 T3N0M0; 1 T3N1M0; 6 T3N2M0). Stage could not be evaluated in four cases. Thirteen patients developed groin lymph node metastases (six of them could be evaluated) and thirteen patients died due to PSCC progression (cancer-specific mortality) (Table 1). Ten patients developed local recurrences. Median follow-up period was 49 months (range 1–252 months).

The most frequent PSCC histopathological type was the usual type (67%) (Table 2). Differentiation patterns were as follows: well-differentiated (26 cases), moderately-differentiated (17 cases) and poorly-differentiated (21 cases).

HPV detection and typification in this set of tumors was recently reported by our group (35.9% of the cases harbored an HPV infection and 95.7% of them corresponded to high risk HPV, mainly HPV16).⁵

3.2. Immunohistochemical features and clinicopathological data

Loss of membranous E-cadherin was observed in 46 out of 64 cases (71.8%) (Figure 1). We next analyzed Vimentin expression in the TMAs, and we determined the simultaneous loss of membranous E-cadherin expression and Vimentin over-expression, as a mean to quantify *bona fide* EMT. Using these two markers, EMT was shown in 27 out of 62 cases (43.5%) (two cases were lost for Vimentin evaluation).

Since we observed EMT in almost half of the PSCC tumors, we next investigated whether they also displayed expression of some EMT-related transcription factors. Immunohistochemical analysis revealed that 77.3% of the samples expressed Zeb1, while Twist expression was present in 12.9% of the evaluated samples (Figure 2). No significant association between Zeb1 or Twist expression and the presence of EMT was found. Snail expression was detected in isolated neoplastic cells (less than 10%), making the statistical analysis irrelevant.

Mortality was higher among cases showing EMT (33.0% vs. 11.4%; $P=0.035$). A Cox proportional hazards model demonstrated that tumors showing EMT had a significantly increased mortality compared with tumors without EMT (hazard risk of 3.6; 95% CI 1.02-12.9). The Kaplan Meier survival analysis demonstrated a significantly improved 10-year survival for those patients without EMT (Figure 3A).

Recurrence rates were higher in patients with tumors showing EMT markers (29.6% vs. 6.2%; $P=0.017$). Quite surprisingly, EMT expression was not increased in metastasizing tumors vs. non-metastasizing tumors (25% vs. 15%, $P=$ non-significant).

No association was found between E-cadherin, Vimentin, Zeb1 or Twist and the TNM stage or the differentiation pattern.

Nuclear or cytoplasmic E-cadherin expression could be observed in some cases with lost membranous expression ($n=46$): nuclear expression was detected in 12 out of 46 cases (26%) and cytoplasmic expression in 5 cases out of 46 cases (10.8%). Although loss of membranous E-cadherin was not associated with bad prognosis, nuclear E-cadherin expression was significantly associated with a greater mortality: 41.6% of the patients expressing nuclear E-cadherin died due to the disease versus 15.3% of other groups ($P<0.05$). Furthermore, the Kaplan Meier survival analysis also showed that the group of PSCCs with nuclear E-cadherin was associated with a worse prognosis (Figure 3B).

Finally, we assessed the presence of EMT markers in 6 PSCC metastatic samples. We did not find any significant association in the expression of EMT markers or E-cadherin loss in the metastasis when compared with their corresponding primary tumors. However, two metastases showed nuclear E-cadherin expression that was also observed in the primary tumors.

3.3. Association between immunohistochemical markers, histopathological subtypes and HPV status

EMT was differentially expressed depending on the histopathological subtype of PSCC (Table 2).

HPV infection was significantly associated with loss of membranous E-cadherin. Twenty-two out of 23 (95.7%) HPV-positive tumors did not express membranous E-cadherin whereas only 24 out of 41 (58.5%) of HPV negative tumors lacked membranous expression ($P < 0.001$). Conversely, the presence of HPV was not associated with EMT (40.9% of HPV-positive cases showed EMT vs 45% of HPV-negative cases; $P =$ non-significant).

4. Discussion

During EMT, epithelial cells acquire mesenchymal-like properties, such as loss of membranous E-cadherin and gain of Vimentin expression.⁹ We here report that the EMT process takes places in 43% of the cases in our PSCC series, and that this feature is linked to an increased mortality and recurrence.

Functional loss of E-cadherin occurring in carcinogenesis can take place through a variety of mechanisms such as miss-localization, gene mutations, promoter hypermethylation or transcriptional repression, being the latter the predominant mechanism controlling the expression of E-cadherin in most carcinomas.¹⁷ Direct E-cadherin repressors are the Snail family, the basic helix–loop–helix factor E47, and two members of the Zeb family.¹⁷ In addition Twist can suppress the transcription of E-cadherin and modulate the expression of mesenchymal targets to promote an EMT.¹⁸ However, in contrast to our previous report in cutaneous SCC,¹⁶ we have been unable to demonstrate in PSCC a relationship between any of the studied EMT-related transcription factor and EMT. Since the EMT process is highly cell context-dependent, it is possible that other EMT-related transcription factors different to those investigated in the present study are involved in the downregulation of E-cadherin and EMT in PSCC.

The HPV infection might also be a candidate for E-cadherin regulation and/or EMT induction in PSCC. In this sense, we found HPV to be associated with loss of membranous E-cadherin. Our results are in accordance with previous *in vitro*

studies that have shown that E7 and E6 HPV proteins may trigger an E-cadherin downregulation in keratinocyte cultures.¹⁹ An HPV-induced loss of E-cadherin expression in PSCC could also be due to an HPV-related loss of chromosome 16q, which harbors the *E-cadherin* gene, as reported in oral squamous cell carcinomas.²⁰ Conversely, we did not find an association between HPV and EMT. A previous study by our group in this series of patients demonstrated an association between HPV and a better prognosis in PSCC.⁴ Statistical correlation between HPV and better outcome has also been reported in vulvar cancer.²¹ Accordingly to Rodrigues and collaborators, HPV-related vulvar tumors do not seem to undergo an EMT phenomenon, commonly associated to worse prognosis in cancer.²¹ Taken together, all the above-mentioned features suggest that E-cadherin downregulation by HPV does not trigger EMT or leads to a more aggressive phenotype.

In our study, we have been unable to identify any candidate triggering factor for EMT, although a significant association between EMT and higher recurrence rates in PSCC was detected. In several malignant tumors, EMT has widely been associated with lymphatic metastases.^{7,13,22,23} However, in our series we have not found such an association. A low sample size effect could explain this phenomenon. Alternatively, the lack of association between EMT and a higher risk of lymph node metastases might suggest that EMT better favors local recurrence in PSCC. The anatomical location of these tumors may determine a high risk of loco-regional progression that may cause fatal outcomes while lymph nodes are bypassed^{24,25}.

Interestingly, we have also observed nuclear E-cadherin expression in several aggressive tumors. Nuclear E-cadherin expression has previously been reported in both esophageal SCCs and pancreatic endocrine tumors.^{26,27} A cleaved E-cadherin cytosolic fragment may be translocated to the nucleus and participate in the regulation of gene expression. The presence of nuclear E-cadherin in two out of six metastatic samples suggests that this fragment is required for the biology of the tumoral cell that has already left the primary tumor, pointing to functions besides, and maybe in addition, to cell dissemination. Although a possible relationship between nuclear E-cadherin and bad prognosis has been reported,^{26,28} their precise role has not been fully established yet.

In our series, E-cadherin and Vimentin are differently expressed depending on the histological subtype. Although the number of evaluated sarcomatoid tumors was low (three cases), all our cases of this aggressive form of PSCC²⁵ showed increased nuclear E-cadherin and Vimentin expression (EMT). On the other hand, the verrucous type, commonly associated to good prognosis,²⁹ did not express EMT markers. These data suggest that EMT may play a role in the different biological behavior of the different PSCCs subtypes.

Our study has some limitations that should be pointed out. Firstly, there are inherent biases and potential errors of a retrospective study and although some patients were followed for a long period of time, a five-year follow-up period could not be achieved in all cases. Moreover, treatment protocols may have been heterogeneous in the two centers that participated in the study and may

have evolved and changed in the long inclusion period of time. Secondly, the extensive time taken to recruit patients involves different treatments and this may influence the recurrence rates. Thirdly, we could not study all patients due to loss of TMA cylinders. Finally, some immunohistochemistry studies were only performed in 2 mm cylinders, which could render non-representative results in tumors with heterogeneous areas.

In conclusion, our study demonstrates that the EMT process is associated with an increased mortality rate and with aggressive PSCC subtypes. Our findings also suggest that HPV infection may promote E-cadherin downregulation without inducing an EMT program.

Acknowledgments

We thank Miquel Taverna for his assistance in obtaining photographic images. We are in debt with Sergi Mojal and Laia Miquel for their review in the statistical analyses and Tania Lobato for laboratory technical support.

References

1. Cubilla, A. L.: The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World J Urol*, 27: 169, 2009.
2. Daling, J. R., Madeleine, M. M., Johnson, L. G., et al.: Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer*, 116: 606, 2005.
3. Mannweiler, S., Sygulla, S., Winter, E., et al.: Two major pathways of penile carcinogenesis: HPV-induced penile cancers overexpress p16ink4a, HPV-negative cancers associated with dermatoses express p53, but lack p16ink4a overexpression. *J Am Acad Dermatol*, 69: 73, 2013.
4. Masferrer, E., Ferrandiz-Pulido, C., Lloveras, B., et al.: MYC copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. *J Urol*, 188: 1965, 2012.
5. Ferrandiz-Pulido, C., Masferrer, E., de Torres, I., et al.: Identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penile squamous cell carcinomas: correlation with pathologic subtypes, p16(INK4a) expression, and prognosis. *J Am Acad Dermatol*, 68: 73, 2013.
6. Samir, R., Asplund, A., Tot, T., et al.: High-risk HPV infection and CIN grade correlates to the expression of c-myc, CD4+, FHIT, E-cadherin, Ki-67, and p16INK4a. *J Low Genit Tract Dis*, 15: 280, 2011.
7. Stenner, M., Yosef, B., Huebbers, C. U., et al.: Nuclear translocation of beta-catenin and decreased expression of epithelial cadherin in human papillomavirus-positive tonsillar cancer: an early event in human papillomavirus-related tumour progression? *Histopathology*, 58: 1117, 2011.
8. Leong, C. M., Doorbar, J., Nindl, I., et al.: Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. *Br J Dermatol*, 163: 1253, 2010.
9. Thiery, J. P.: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2: 442, 2002.
10. Campos, R. S., Lopes, A., Guimaraes, G. C., et al.: E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology*, 67: 797, 2006.
11. Zhu, Y., Zhou, X. Y., Yao, X. D., et al.: The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile

- squamous cell carcinoma treated with surgery. *BJU Int*, 100: 204, 2007.
12. Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A.: Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, 48: 365, 2004.
 13. Zeisberg, M. and Neilson, E. G.: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119: 1429, 2009.
 14. Sobin L.H., Gospodarowicz. M. K., Wittekind, C. (Editors): *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition. UICC International Union Against Cancer. Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 239, 2009.
 15. Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., et al.: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4: 844, 1998.
 16. Toll, A., Masferrer, E., Hernandez-Ruiz, M. E., et al.: Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci*, 72: 93, 2013.
 17. Garcia de, H. A. and Baulida, J.: Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*, 1825: 223, 2012.
 18. Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., et al.: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117: 927, 2004.
 19. D'Costa, Z. J., Jolly, C., Androphy, E. J., et al.: Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. *PLoS One*, 7: e48954, 2012.
 20. Klusmann, J. P., Mooren, J. J., Lehnen, M., et al.: Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res*, 15: 1779, 2009.
 21. Rodrigues, I. S., Lavorato-Rocha, A. M., de M Maia, B., et al.: Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV. *Br J Cancer*, 109: 184, 2013.
 22. Gotzmann, J., Mikula, M., Eger, A., et al.: Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res*, 566: 9, 2004.
 23. Schulte, J., Weidig, M., Balzer, P., et al.: Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochem Cell Biol*, 138: 847, 2012.

24. Padmavathy, L., Rao, L. L., Sylvester, et al.: In-transit metastases from squamous cell carcinoma penis. *Indian J Dermatol*, 57: 291, 2012.
25. Velazquez, E. F., Melamed, J., Barreto, J. E., et al.: Sarcomatoid carcinoma of the penis: a clinicopathologic study of 15 cases. *Am J Surg Pathol*, 29: 1152, 2005.
26. Chetty, R., Serra, S., and Asa, S. L.: Loss of membrane localization and aberrant nuclear E-cadherin expression correlates with invasion in pancreatic endocrine tumors. *Am J Surg Pathol*, 32: 413, 2008.
27. Salahshor, S., Naidoo, R., Serra, S., et al.: Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol*, 21: 271, 2008.
28. Keck, B., Wach, S., Kunath, F., et al.: Nuclear E-cadherin expression is associated with the loss of membranous E-cadherin, plasmacytoid differentiation and reduced overall survival in urothelial carcinoma of the bladder. *Ann Surg Oncol*, 20: 2440, 2013.
29. Micali, G., Nasca, M. R., Innocenzi, D., et al.: Penile cancer. *J Am Acad Dermatol*, 54: 369, 2006.

Figure legends:

Figure 1. E-cadherin expression in penile SCC. A. Verrucous penile squamous cell carcinoma showing a normal membranous E-cadherin pattern. **B:** Warty PSCC showing a membranous E-cadherin loss. **C.** Usual type PSCC showing membranous E-cadherin loss. **D.** Basaloid PSCC showing nuclear and cytoplasmic E-cadherin expression. **E.** Mixed tumor showing membranous E-cadherin expression in the usual type component and cytoplasmic expression pattern in the basaloid component. **F.** Sarcomatoid PSCC showing nuclear E-cadherin. Original magnification x100.

Figure 2. Expression of epithelial to mesenchymal markers in penile SCC.

A. Hematoxylin and eosin staining showing a verrucous PSCC with membranous E-cadherin (**B**), negative Vimentin expression (**C**), no Twist expression (**D**) and no Zeb1 expression (**E**). **F.** Hematoxylin and eosin staining showing a sarcomatoid PSCC with nuclear E-cadherin expression (**G**), Vimentin expression (**H**), nuclear Twist expression (**I**) and nuclear Zeb1 expression (**J**). Original magnification x100.

Figure 3. Kaplan-Meier analysis. A. Epithelial to mesenchymal transition markers are significantly associated with mortality ($P=0.05$). **B.** Nuclear E-cadherin expression is significantly associated with mortality ($P<0.05$).

Abbreviations and Acronyms

EMT = epithelial to mesenchymal transition

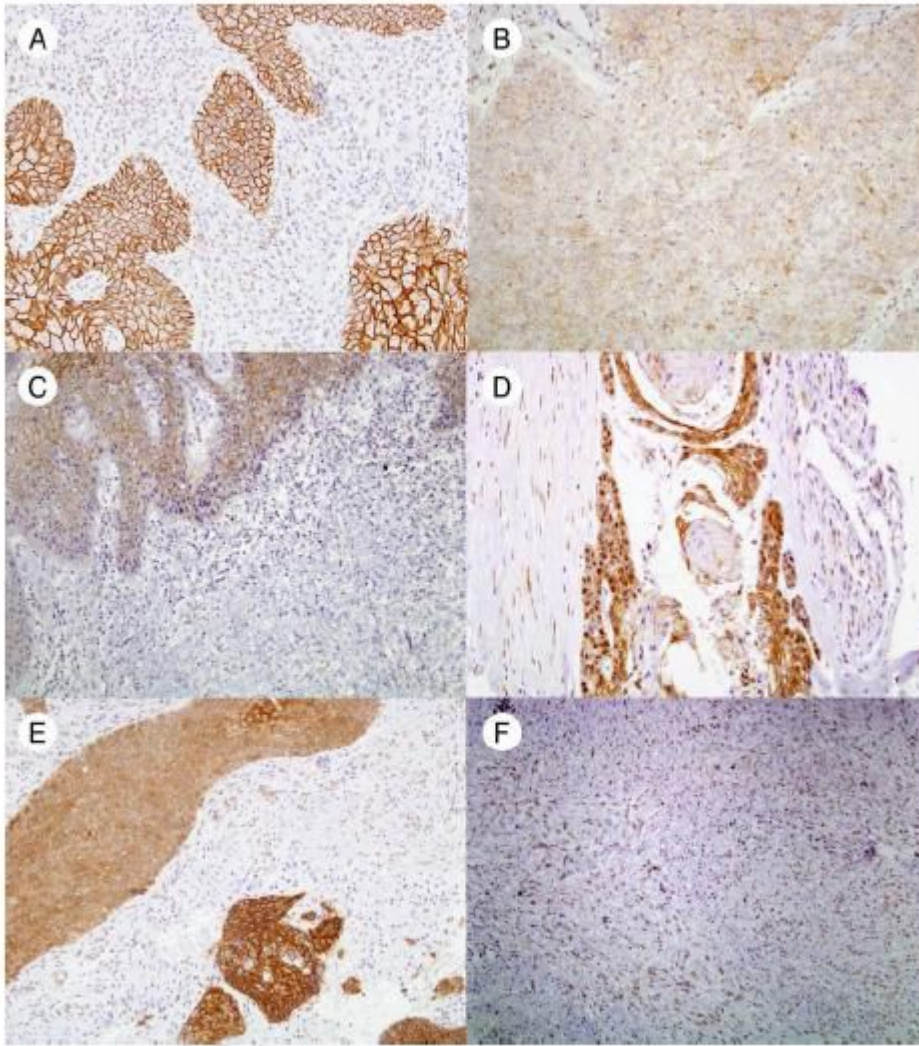
SCC = squamous cell carcinoma

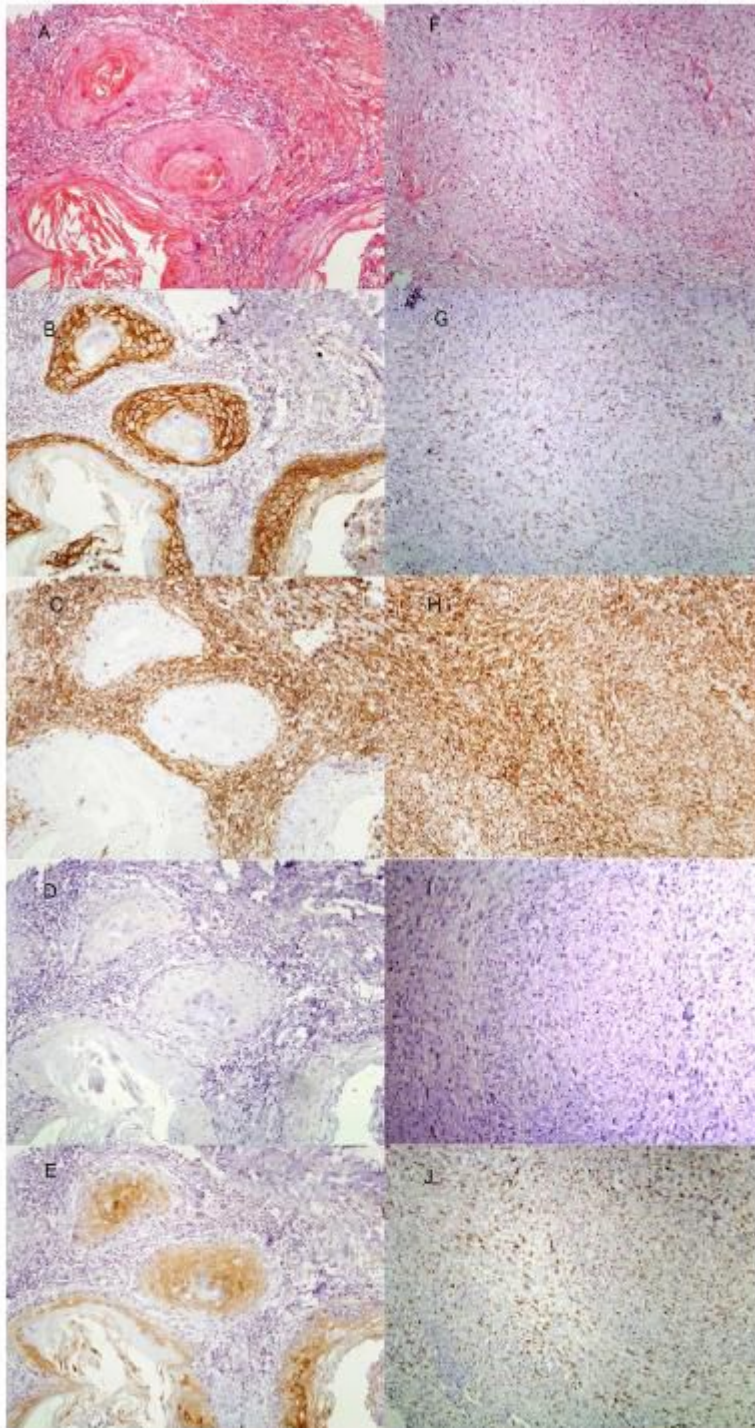
HPV = human papillomavirus

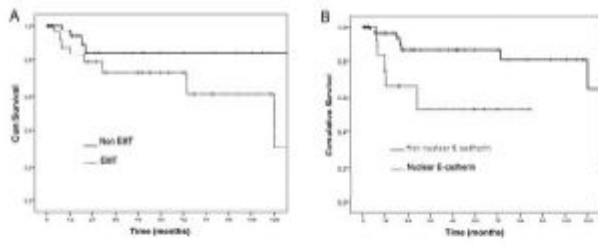
PSCC = Penile squamous cell carcinoma

TMA = Tissue microarrays

ACCEPTED MANUSCRIPT







ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1: Stage, treatment modality and outcome in patients with PSCC and presence of EMT.

	Treatment modality			Disease specific death
	Surgery (n)	LND	RDT+/- CT	
Stage I (n= 29)				
EMT (n=12)	Partial penectomy (9)			1
	Postectomy (2)			1
	Simple excision (1)			
No EMT (n=17)	Partial penectomy (8) Postectomy (4) Glandectomy (1) Simple excision (4)			
Stage II (n=13)				
EMT (n=7)	Total penectomy (1)	1		
	Partial penectomy (5)	2	1	1
	Glandectomy (1)		1	1
No EMT (n=6)	Total penectomy (1)	1	1	1
	Partial penectomy (5)	4	1	1
Stage III (n=18)				
EMT (n=7)	Total penectomy (1)		1	1
	Partial penectomy (5)	3	2	3
	Biopsy (1)		1	1
No EMT (n=11)	Total penectomy (3)	2	1	1
	Partial penectomy (8)	3	6	1

LND: lymph node dissection, RDT: radiotherapy, CT: chemotherapy

Table 1: Presence of EMT depending on the histopathological types of PSCC.

		EMT (n=27)	No EMT (n=35)*
		n (%)	n (%)
Histopathological type	Total		
Usual	n=42 (67.7%)	17 (40.5)	25 (59.5)
Warty	n= 4 (6.4%)	3 (75)	1 (25)
Verrucous	n=4 (6.4%)	1 (25)	3 (75)
Basaloid + mixed basaloid/usual-type	n=9 (14.5%)	3 (33)	6 (66)
Sarcomatoid	n=3 (4.8%)	3 (100)	- (0)

* Two cases showing membranous E-cadherin were lost for Vimentin expression evaluation.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

En aquest treball hem volgut estudiar diversos marcadors per tal d'identificar aquells que ens permetin predir quin pacient amb CEP desenvoluparà metàstasis i determinar el pronòstic tumoral.

Com ja s'ha explicat anteriorment, la importància de tenir ben classificats els pacients per grups pronòstics és múltiple: per una banda permet un tractament a nivell local menys agressiu, amb més conservació anatòmica i funcional i per altre banda facilita identificar aquells pacients que es beneficiaran d'una limfadenectomia immediata.

Els paràmetres usats fins al moment per a predir el risc de metàstasis són paràmetres bàsicament clínics (mida del tumor, localització) i histològics (grau, tipus, espessor, patró d'infiltració).¹³ En els darrers anys ha augmentat l'interès per a identificar marcadors immunohistoquímics, serològics, genètics, entre d'altres que puguin ajudar a una classificació pronòstica dels nostres pacients, permetent un abordatge terapèutic més acurat. Progressivament s'han anat descrivint diversos marcadors relacionats amb mal pronòstic com són: l'expressió del factor de creixement derivat de l'hepatoma (FCDH)⁶⁹ o baixos nivells de Proteïna C reactiva (PCR) en sèrum.⁷⁰ Però molt més interessant és l'estudi de marcadors pronòstic que a més a més poden ser dianes terapèutiques de nous medicaments. En aquesta línia la descripció en el CEP d'un augment en l'expressió del factor de creixement epidèrmic (rFCE)⁷⁰ o d'una activació de la via mTOR⁴⁵ ofereix noves i prometedores opcions terapèutiques.

Seguint aquesta línia d'interès, vam estudiar la presència d'aberracions numèriques del gen *MYC*, en tota la carcinogènesis del CEP. Vam poder observar com aquestes anaven augmentant a mesura que progressava la malaltia, tal com prèviament s'havia descrit en carcinomes escatosos d'altres localitzacions.⁴⁸ Però a més a més, el nostre estudi permet identificar dos grups amb pronòstics clarament diferenciats. Si establim un punt de tall d'un 30% de guanys (més del 30% dels nuclis amb més de dues còpies del gen) obtenim dos grups, un amb una mortalitat menor al 5% (tumors amb menys d'un 30% de guanys) i un altre amb una mortalitat de quasi un 50% (tumors amb igual o més d'un 30% de guanys).⁷⁰ Aquestes dades ens permeten pensar que la introducció del FISH en l'estudi del CEP pot ser útil en la pràctica clínica habitual, tal com ja succeeix en altres tipus de tumors com el melanoma o l'angiosarcoma.^{71,72} A més a més, la demostració d'aberracions numèriques de *MYC*, en el CEP, així com l'augment de la seva expressió, obren la porta a l'ús de múltiples molècules que tenen com a diana terapèutica a *MYC* i que estan sent investigades actualment com per exemple: Selol,⁷³ EZH2,⁷⁴ OP449,⁷⁵ Omomyc.⁷⁶

La TEM, estudiada en el CEP en el segon estudi, s'ha relacionat amb l'augment de metàstasis en diversos tumors.^{61,79,80} A priori semblava un marcador molt prometedor per a poder definir millor aquells pacients tributaris d'una limfadenectomia immediata. Desafortunadament, els resultats del nostre estudi no mostren cap relació entre la presència de TEM i el risc de metàstasis. Però si que mostren dues dades importants en referència al pronòstic, doncs tant la presència de TEM com de Caderina-E nuclear s'associen a major mortalitat específica en el CEP.⁸¹ La troballa de Caderina-E nuclear ha estat descrita

prèviament en poques ocasions i sempre associada a un pitjor pronòstic. Els tumors amb expressió nuclear de Caderina-E descrits fins a l'actualitat són: el carcinoma escatós d'uretra, d'esòfag i en el carcinoma de pàncrees.⁸²⁻⁸⁴ A més a més, també vam observar la presència de Caderina-E nuclear a algunes metàstasis. Tot això suggeriria que aquest fragment de Caderina-E tindria alguna funció al nucli donant a la cèl·lula més capacitat de disseminació.

Diversos treballs han intentat extrapolar al CEP els resultats obtinguts en estudis realitzats en el carcinoma escatós de cèrvix (CEC). Així durant molt de temps es va pensar que el CEP era l'equivalent masculí del CEC. Com el CEC és un tumor molt més freqüent, representa el segon tumor en freqüència en dones,⁸⁵ ha sigut objecte de molts estudis i investigacions i en canvi el CEP, molt més rar, pràcticament no havia rebut atenció per part de la comunitat mèdica. Però en els últims anys, múltiples estudis en CEP han posat de manifest diferències notables respecte del CEC com són:

- Presència del VPH. Pràcticament omnipresent en el CEC i representant entre un 30-60% dels casos en el CEP.
- Edat d'aparició. Mentre en el cas femení és un tumor propi de noies joves, en el masculí és més propi de persones d'edat avançada.
- Possible prevenció. El CEP en aquelles cultures que realitzen una postectomia a la infància és un tumor pràcticament inexistent .

- Lesions predisponents. El CEP pot desenvolupar-se sobre lesions inflamatòries prèvies com el líquen esclerós i atròfic o el líquen pla. Això no ha estat descrit pel CEC.

Sembla doncs que els estudis en cèrvix no són extrapolables al penis, però en canvi s'ha vist que en molts aspectes el carcinoma escatós de vulva (CEV) sí que té unes característiques similars al CEP. El CEV té una presència de VPH similar,⁸⁶ és més propi d'edats avançades⁸⁶ i també es pot originar sobre malalties inflamatòries cròniques com el líquen esclerós i atròfic o el líquen pla.⁸⁷

Aquests canvis en la manera d'entendre el CEP i el CEV ha permès constatar que de fet existien dos CEPs diferenciats, un relacionat amb el VPH i un independent del VPH.²¹ Aquell relacionat amb el VPH apareix en gent més jove, i sembla tenir un millor pronòstic,⁹ en canvi, el CEP que no presenta el VPH, apareix en gent d'edat avançada, sovint sobre lesions inflamatòries cròniques, i sembla tenir pitjor pronòstic. En els nostres estudis aquestes diferències també s'han posat de manifest:

- En el primer treball es va observar que les aberracions numèriques de *MYC* eren independents de la presència del virus. Però en canvi, l'expressió de Myc estava clarament influenciada pel virus. Es pot observar com en els casos VPH negatiu hi havia una associació entre el número de còpies i l'expressió de la proteïna, però en aquells VPH-positius l'expressió de Myc estava augmentada encara que el número de còpies del gen fos normal. Això possiblement és degut a la capacitat que té el virus d'unir-se a la regió 8q24 i activar *MYC*,^{52,53,54} de manera que

en aquests casos l'expressió de la proteïna Myc, ja no es relacionaria amb el número de còpies del gen.

- El segon treball també descriu diferències en l'expressió de Caderina-E de membrana entre els casos amb presència del virus i els que no. Més del 95% de casos infectats pel virus presenten pèrdua de Caderina-E de membrana, percentatge que baixa a menys del 25% entre els casos no infectats. Aquesta troballa fa pensar que el virus podria estar actuant alterant els mecanismes d'unió intercel·lular. Per contra, no hem trobat associació entre el virus i el guany de Vimentina. Com s'ha comentat anteriorment, per parlar de TEM cal que les cèl·lules perdin Caderina-E de membrana i adquireixin característiques mesenquimals expressant Vimentina. En aquest cas, sembla que el virus seria capaç d'inhibir Cadherina-E, però no de causar el fenomen de TEM.

En els últims anys s'han desenvolupat dues vacunes contra el VPH. Una tetravalent (Gardasil® aprovada per la FDA als E.U.A el Juny del 2006) activa contra VPH 16, 18, 6 i 11; i una bivalent (Cervarix® aprovada per la FDA a finals del 2006) activa contra VPH 16 i 18.⁸⁸ Inicialment aquestes vacunes es van administrar a noies amb la intenció de prevenir el CEC.⁸⁹ Posteriorment, es va aprovar el seu ús en homes que tenen sexe amb homes (HSH) per a la prevenció del carcinoma escatós d'anús.^{90,91} Possiblement l'administració d'aquesta vacuna a tots els homes previndria una part dels CEP. Però els estudis de cost-efectivitat mostren com (degut a la baixa incidència d'aquest càncer i l'alt preu de les vacunes) la vacunació de tots els homes no és cost-efectiva. Per aquest motiu, tot i disposar d'aquesta vacuna des de fa quasi una

dècada, només s'administra a aquells homes que presenten un alt risc (els HSH).⁹² Els estudis de cost eficàcia, però, contempen dues situacions en les que l'administració de la vacuna a tots els homes seria recomanable. La primera, en cas que el preu de la vacuna es reduís; i la segona, en aquelles poblacions que per motius socioeconòmics o culturals el percentatge de dones vacunades sigui baix.⁹²

Aquest estudi té unes limitacions, ja comentades prèviament i descrites als articles que són:

- Propis dels TMA: El fet d'usar un TMA en un tumor sòlid, que pot ser heterogeni, pot comportar un biaix en estudiar una part no representativa del tumor. Per intentar reduir aquest biaix es van fer cilindres de 2mm (els més grans possibles en aquesta tècnica) i algunes tincions es van realitzar en el bloc sencer i al TMA comparant-se després el resultat. Aquest doble anàlisi (al bloc sencer i al TMA) es va realitzar per Caderina-E i Vimentina, observant resultats molt similars entre un mètode d'estudi i l'altre.
- Propis d'un estudi retrospectiu: la baixa prevalença del tumor va requerir agafar mostres d'un període de temps molt ampli per a poder recollir una n adequada.
- Seguiment incomplet: no fou possible seguir 5 anys a tots els pacients.

Aquest treball és un pas més en l'estudi d'una malaltia poc freqüent i molt poc estudiada fins ara. S'ha fet un especial èmfasi en la cerca d'aquells marcadors

amb potencial valor pronòstic, en intentar determinar la influència del VPH en aquesta malaltia i en descriure noves dianes terapèutiques per aquells pacients amb malalties en estadis avançats.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1.- El VPH és present aproximadament en el 40 % dels CEP, essent el VPH 16 el més freqüent.

2.- El nombre d'aberracions numèriques de *MYC* va augmentant a mesura que progressa la carcinogènesi del CEP essent inexistent a l'epiteli normal i augmentant progressivament al carcinoma *in situ*, invasor i la metàstasi.

3.- La presència del VPH no influeix en el número de còpies de *MYC* però sí que es relaciona amb un augment de l'expressió de Myc. En els casos VPH-negatius el número de còpies de *MYC* es relaciona amb l'expressió de Myc.

4.- La mortalitat, el risc de recurrència i d'aparició de metàstasi augmenten en augmentar el nombre d'aberracions numèriques de *MYC*, podent-se establir un punt de tall al 30% de les cèl·lules.

5.- El VPH es relaciona amb la pèrdua de Caderina-E de membrana, però no amb la presència de TEM.

6.- El fenomen de TEM s'associa a un augment de mortalitat i una disminució de la supervivència però no a un augment del risc de metàstasi.

7.- La presència de Caderina-E nuclear s'associa a pitjor pronòstic.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

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

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

3.- Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al, eds. Cancer incidence in five continents. Vol. IX. Lyon: IARC Scientific Publications; 2007, No. 160.

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

5.- Alba Álvarez-Abella, Emili Masferrer, Sara Martín-Sala, Anna Jucglà. Carcinoma epidermoide de pene p i e l (barc). 2011; 2187: 15 – 22.

6.- Minhas S, Manseck A, Watya S, Hegarty PK. Penile cancer--prevention and premalignant conditions. *Urology*. 2010;76:S24-35

7.- Van Howe RS, Hodges FM. The carcinogenicity of smegma: debunking a myth. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20:1046-54.

8.- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348:518-27.

9.- Ferrándiz-Pulido C, Masferrer E, de Torres I, et al. Identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penile squamous cell carcinomas: correlation with pathologic subtypes, p16(INK4a) expression, and prognosis. *J Am Acad Dermatol*. 2013; 68:73-82.

10.- Horenblas S, von Krogh G, Cubilla AL, et al. Squamous cell carcinoma of the penis: premalignant lesions. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2000;205:187-8.

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

12.- 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;62:870-8.

13.- Brady KL, Mercurio MG, Brown MD. Malignant tumors of the penis. *Dermatol Surg*. 2013; 39:527-47.

14.- Bleeker MC, Heideman DA, Snijders PJ, Horenblas S, Dillner J, Meijer CJ. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol*. 2009; 27:141-50.

15.- Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer*. 2005; 116:606-16.

16.- Renaud-Vilmer C, Cavelier-Balloy B, Verola O, et al. Analysis of alterations adjacent to invasive squamous cell carcinoma of the penis and their relationship with associated carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62:284-90.

17.- Eisen RF, Bhawan J, Cahn TH. Spontaneous regression of bowenoid papulosis of the penis. *Cutis*. 1983; 32:269-72.

18.- Micali G, Innocenzi D, Nasca MR, Musumeci ML, Ferraú F, Greco M. Squamous cell carcinoma of the penis. *J Am Acad Dermatol*. 1996;35:432-51.

19.- Barocas DA, Chang SS. Penile cancer: clinical presentation, diagnosis, and staging. *Urol Clin North Am*. 2010; 37:343-52.

20.- Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003. *Cancer*. 2008;11:2883-91.

21.- Mannweiler S, Sygulla S, Winter E, Regauer S. Two major pathways of penile carcinogenesis: HPV-induced penile cancers overexpress p16ink4a, HPV-negative cancers associated with dermatoses express p53, but lack p16ink4a overexpression. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69:73-81.

22.- Mannweiler S, Sygulla S, Beham-Schmid C, Razmara Y, Pummer K, Regauer S. Penile carcinogenesis in a low-incidence area: a clinicopathologic and molecular analysis of 115 invasive carcinomas with special emphasis on chronic inflammatory skin diseases. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:998-1006

23.- Ornellas AA, Kinchin EW, Nóbrega BL, Wisnesky A, Koifman N, Quirino R. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol*. 2008;97:487-95.

24.- Gulia AK, Mandhani A, Muruganandham K, Kapoor R, Ansari MS, Srivastava A. Impact of delay in inguinal lymph node dissection in patients with carcinoma of penis. *Indian J Cancer*. 2009; 46:214-8.

25.- McDougal WS. Carcinoma of the penis: improved survival by early regional lymphadenectomy based on the histological grade and depth of invasion of the primary lesion. J Urol. 1995;154:1364-6.

26.- Kroon BK, Horenblas S, Lont AP, Tanis PJ, Gallee MP, Nieweg OE. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. J Urol. 2005;173:816-9.

27.- Margulis V, Sagalowsky AI. Penile cancer: management of regional lymphatic drainage. Urol Clin North Am. 2010; 37:411-9.

28.- Cox NH, Eedy DJ, Morton CA. Guidelines for management of Bowen's disease: 2006 update. Br J Dermatol. 2007;156:11-21

29.- Goette DK, Carson TE. Erythroplasia of Queyrat: treatment with topical 5-fluorouracil. Cancer. 1976;38:1498-502.

30.- Taliaferro SJ, Cohen GF. Bowen's disease of the penis treated with topical imiquimod 5% cream. J Drugs Dermatol. 2008;7:483-5.

31.- Toro JR, Sanchez S, Turiansky G, Blauvelt A. Topical cidofovir for the treatment of dermatologic conditions: verruca, condyloma, intraepithelial neoplasia, herpes simplex and its potential use in smallpox. Dermatol Clin. 2003; 21:301-9.

32.- Alnajjar HM, Lam W, Bolgeri M, Rees RW, Perry MJ, Watkin NA. Treatment of carcinoma in situ of the glans penis with topical chemotherapy agents. *Eur Urol.* 2012; 62:923-8.

33.- Van Bezooijen BP, Horenblas S, Meinhardt W, Newling DW. Laser therapy for carcinoma in situ of the penis. *J Urol.* 2001;166:1670-1.

34.- Tietjen DN, Malek RS. Laser therapy of squamous cell dysplasia and carcinoma of the penis. *Urology.* 1998; 52:559-65.

35.- Paoli J, Ternesten Bratel A, Löwhagen GB, Stenquist B, Forslund O, Wennberg AM. Penile intraepithelial neoplasia: results of photodynamic therapy. *Acta Derm Venereol.* 2006;86:418-21

36.- Axcrona K, Brennhovd B, Alfsen GC, Giercksky KE, Warloe T. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate for atypical carcinoma in situ of the penis. *Scand J Urol Nephrol.* 2007;41:507-10

37.- Greenberg RE. Surgical management of carcinoma of the penis. *Urol Clin North Am.* 2010; 37:369-78.

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

39.- Shindel AW, Mann MW, Lev RY, et al. Mohs micrographic surgery for penile cancer: management and long-term followup. J Urol. 2007;178:1980-5.

40.- Crook J. Radiation therapy for cancer of the penis. Urol Clin North Am. 2010;37:435-43.

41.- Trabulsi EJ, Hoffman-Censits J. Chemotherapy for penile and urethral carcinoma. Urol Clin North Am. 2010;37:467-74.

42.- Börgermann C, Schmitz KJ, Sommer S, Rübber H, Krege S. Characterization of the EGF receptor status in penile cancer : retrospective analysis of the course of the disease in 45 patients. Urologe A. 2009;48:1483-9.

43.- Lavens N, Gupta R, Wood LA. EGFR overexpression in squamous cell carcinoma of the penis. Curr Oncol. 2010;17:4-6.

44.- 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;113:871-7.

45.- Ferrandiz-Pulido C, Masferrer E, Toll A, et al. mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and pelf4E over expression correlate with aggressive tumor behavior. *J Urol.* 2013;190:2288-95.

46.- Chaux A, Munari E, Katz B, et al. The epidermal growth factor receptor is frequently overexpressed in penile squamous cell carcinomas: a tissue microarray and digital image analysis study of 112 cases. *Hum Pathol.* 2013;44:2690-5.

47.- Martín-Ezquerria G, Salgado R, Toll A, et al. Multiple genetic copy number alterations in oral squamous cell carcinoma: study of MYC, TP53, CCDN1, EGFR and ERBB2 status in primary and metastatic tumours. *Br J Dermatol.* 2010; 163:1028-35.

48.- Toll A, Salgado R, Yébenes M, et al. Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol.* 2010;19:151-3

49.- Toll A, Masferrer E, Hernández-Ruiz ME, et al. Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci.* 2013;72: 93-102.

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

51.- Pelengaris S, Littlewood T, Khan M, Elia G, Evan G. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell*. 1999; 3: 565-77.

52.- Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr 1. Epub ahead of print.

53.- Macville M, Schröck E, Padilla-Nash H, et al. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res*. 1999; 59:141-50.

54.- Brink AA, Wiegant JC, Szuhai K, et al Simultaneous mapping of human papillomavirus integration sites and molecular karyotyping in short-term cultures of cervical carcinomas by using 49-color combined binary ratio labeling fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;134:145-50.

55.- Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene*. 2006;25:5985-93

- 56.- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002; 2:442-54.
- 57.- Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. Urology. 2006;67:797-802.
- 58.- Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. Int J Dev Biol. 2004; 48:365-75.
- 59.- Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest. 2009;119:1429-37.
- 60.- Samir R, Asplund A, Tot T, Pekar G, Hellberg D. High-risk HPV infection and CIN grade correlates to the expression of c-myc, CD4+, FHIT, E-cadherin, Ki-67, and p16INK4a. J Low Genit Tract Dis. 2011;15:280-6.
- 61.- Stenner M, Yosef B, Huebbers CU, et al. Nuclear translocation of β -catenin and decreased expression of epithelial cadherin in human papillomavirus-positive tonsillar cancer: an early event in human papillomavirus-related tumour progression? Histopathology. 2011;58:1117-26.
- 62.- Leong CM, Doorbar J, Nindl I, Yoon HS, Hibma MH. Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. Br J Dermatol. 2010;163:1253-63.

63.- Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2508-17.

64.- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4:844-7.

65.- Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray - a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med*. 2008;37:166-76

66.- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:2934-8.

67.- Anastasi J, Vardiman JW, Rudinsky R, et al. Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridization: an analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1991;77:2456-62.

68.- Price CM. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Rev*. 1993;7:127-34

69.- Li D, Han Z, Liu J, et al. Upregulation of nucleus HDGF predicts poor prognostic outcome in patients with penile squamous cell carcinoma bypass VEGF-A and Ki-67. *Med Oncol.* 2013;30:702.

70.- Steffens S, Al Ghazal A, Steinestel J, et al. High CRP values predict poor survival in patients with penile cancer. *BMC Cancer.* 2013;13:223.

71.- Necchi A, Nicolai N, Colecchia M, et al. Proof of activity of anti-epidermal growth factor receptor-targeted therapy for relapsed squamous cell carcinoma of the penis. *J Clin Oncol.* 2011;29:e650-2.

72.- Masferrer E, Ferrándiz-Pulido C, Lloveras B, et al. MYC copy number gains are associated with poor outcome in penile squamous cell carcinoma. *J Urol.* 2012;188:1965-71.

73.- Manner J, Radlwimmer B, Hohenberger P, et al. MYC high level gene amplification is a distinctive feature of angiosarcomas after irradiation or chronic lymphedema. *Am J Pathol.* 2010;176:34-9.

74.- North JP, Garrido MC, Kolaitis NA, LeBoit PE, McCalmont TH, Bastian BC. Fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool in the diagnosis of ambiguous melanocytic neoplasms: a review of 804 cases. *Am J Surg Pathol.* 2014;38:824-31.

75.- Dudkiewicz-Wilczyńska J, Grabowska A, Książek I, Sitarz K, Suchocki P, Anuszevska E. Comparison of selected gene expression profiles in sensitive and resistant cancer cells treated with doxorubicin and Selol. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18:90-4.

76.- Wee ZN, Li Z, Lee PL, Lee ST, Lim YP, Yu Q. EZH2-Mediated Inactivation of IFN- γ -JAK-STAT1 Signaling Is an Effective Therapeutic Target in MYC-Driven Prostate Cancer. *Cell Rep*. 2014;8:204-16.

77.- Janghorban M, Farrell AS, Allen-Petersen BL, et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:9157-62.

78.- Soucek L, Jucker R, Panacchia L, Ricordy R, Tatò F, Nasi S. Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2002;62:3507-10.

79.- Schulte J, Weidig M, Balzer P, et al. Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochem Cell Biol*. 2012;138:847-60.

80.- Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 2004;566:9-20.

81.- Masferrer E, Ferrándiz-Pulido C, Masferrer-Niubò M, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition in Penile Squamous Cell Carcinoma. *J Urol.* 2014. Epub ahead of print.

82.- Keck B, Wach S, Kunath F, et al. Nuclear E-cadherin expression is associated with the loss of membranous E-cadherin, plasmacytoid differentiation and reduced overall survival in urothelial carcinoma of the bladder. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:2440-5.

83.- Salahshor S, Naidoo R, Serra S, et al. Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2008;21:271-81.

84.- Chetty R, Serra S, Asa SL. Loss of membrane localization and aberrant nuclear E-cadherin expression correlates with invasion in pancreatic endocrine tumors. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:413-9.

85.- Jahic M, Mulavdic M, Dautbasic F, Fejzic M, Jahic E. Frequency of precancerous changes and cervical cancer recorded in three health centres in tuzla canton in period 2010-2011. *Mater Sociomed.* 2013;25:259-61.

...

86.- Siriaunkgul S, Settakorn J, Sukpan K, et al. HPV detection and genotyping in vulvar squamous cell carcinoma in northern Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:3773-8.

87.- Regauer S, Reich O, Eberz B. Vulvar cancers in women with vulvar lichen planus: A clinicopathological study. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71:698-707.

88.- Speck LM, Tyring SK. Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. *Skin Therapy Lett.* 2006;11:1-3.

89.- McCormack PL, Joura EA. Spotlight on quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine(Gardasil®) in the prevention of premalignant genital lesions, genital cancer, and genital warts in women. *BioDrugs.* 2011;25:339-43.

90.- Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, et al. HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 2011;365:1576-85.

91.- Kim JJ. Targeted human papillomavirus vaccination of men who have sex with men in the USA: a cost-effectiveness modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:845-52.

92.- Brisson M, Van de Velde N, Boily MC. Economic evaluation of human papillomavirus vaccination in developed countries. *Public Health Genomics*. 2009;12:343-51.