

**CO-EXPRESSÃO DE CD44 E PROTEÍNAS
DA FAMÍLIA ERM (EZRINA/MOESINA) NO
CARCINOMA DE PÊNIS**

JULIANA BARTHOLO DE ANDRADE

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Andrade, Juliana Bartholo de

**Co-expressão de CD44 e proteínas da família ERM (Ezrina/
Moesina) no carcinoma de pênis** / Juliana Bartholo de Andrade – São
Paulo; 2015.

113p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CARCINOMA. 2. NEOPLASIAS PENIANAS. 3.
ADESÃO CELULAR. 4. ANTÍGENOS CD44

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Doutor Fernando Augusto Soares, pelo carinho, pela disposição, pelos ensinamentos e pela oportunidade de amadurecimento e crescimento profissional.

À Thais Safranov Giuliangelis pela atenção e pelo auxílio na realização de toda a estatística deste trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do trabalho.

Ao Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) por possibilitar a realização deste trabalho, através de suas instalações.

À Liliane Cilento Afonso pela disponibilidade, pelo carinho e pelos bons momentos de descontração.

Aos funcionários do laboratório de imunoistoquímica do AC Camargo Cancer Center, em especial ao José Ivanildo Neves, pelo carinho e auxílio nas padronizações das reações imunoistoquímicas automatizadas.

À Marina França de Resende pelo carinho e colaboração na realização das reações imunoistoquímicas automatizadas.

Aos queridos colegas do CIPE pelas constantes colaborações e por tornarem estes anos de convivência extremamente alegres, inesquecíveis e especiais.

À secretaria de pós-graduação, especialmente à Luciana Pitombeira e à Vanuza Barros Rodrigues de Oliveira, pelas orientações, pela compreensão, pela paciência e pelo carinho.

À Suely Francisco pelo auxílio na revisão e diagramação deste trabalho.

Ao Ricardo Tolla por todo carinho e apoio emocional, que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Às queridas amigas que ganhei com o Doutorado e que levarei para o resto da vida em meu coração, Michelle e Renata, por estarem presentes em todos os momentos, pelo carinho e por tornarem meus dias muito mais felizes.

À minha grande amiga Aline (Xôxa), pela constante presença, mesmo que de longe, pelo seu amor, pelas ajudas e pela força durante todos estes anos.

À minha amada amiga de infância, Tatiana, por sempre me iluminar com seu sorriso repleto de amor e carinho, pelo apoio constante e por ser a chefe de torcida para o meu sucesso.

Ao meu amor, Adriano, por toda compreensão, paciência, carinho, apoio, força, torcida e amor, que, certamente, foram fundamentais para tornarem meus dias muito mais leves e felizes.

Ao meus queridos avós, Aymar e Vera, por todo o amor dedicado a mim e por sempre acreditarem no meu sucesso.

Ao meu amado irmão, Fabiano, meu grande exemplo, por estar sempre por perto, me apoiando e vibrando com minhas realizações.

Aos meus sobrinhos, Victor e Caio, por me ensinarem o que é o amor incondicional e por alegrarem todos os dias da minha vida.

Aos meus amados pais, Maria Stela e Antonio José, por serem meu porto seguro e fazerem de mim uma pessoa melhor a cada dia. Muito obrigada pelo apoio e amor incondicionais, por me encorajarem a sempre lutar pelos meus sonhos e, principalmente, por se orgulharem das minhas conquistas.

RESUMO

Andrade JB. **Co-expressão de CD44 e proteínas da família ERM (Ezrina/Moesina) no carcinoma de pênis.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Na história natural do carcinoma de pênis, o envolvimento loco regional é considerado a complicação mais grave e principal causa de morte da doença. Compreender os processos moleculares que possam estar envolvidos nos mecanismos de invasão e disseminação metastática pode levar a um aprimoramento das ferramentas de prognóstico para uma melhor avaliação dos pacientes, evitando-se, assim, a morbidade de cirurgias desnecessárias. Alguns estudos têm enfatizado a influência da adesão celular no desenvolvimento tumoral e metastático, sendo as proteínas do complexo CD44/ERM (Ezrina, Radixina e Moesina) relatadas como envolvidas nestes processos. Objetivos: Analisar a co-expressão de CD44-Ezrina e de CD44-Moesina no carcinoma epidermóide de pênis, correlacionando esta co-expressão aos critérios clínico patológicos. Casuística, Materiais e Métodos: Foram estudados, retrospectivamente 76 pacientes submetidos à cirurgia para carcinoma epidermóide de pênis no AC Camargo Cancer Center. A avaliação das expressões isoladas de CD44, CD44V6, Ezrina e Moesina foi realizada por imunistoquímica, no equipamento Ventana[®], e a imunorreatividade de cada proteína foi categorizada em positiva e negativa. As co-expressões de Ezrina/CD44, Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44 e Moesina/CD44V6 foram avaliadas, manualmente, por colorações imunistoquímicas de dupla marcação, sendo as imunorreatividades das relações categorizadas em superior a 100 e inferior a 100. Posteriormente, todas as imunorreatividades foram analisadas por microscopia digital através do sistema Aperio[®] ScanScope XT. Resultados: A expressão de CD44 foi observada em 5 (6,6%) casos; CD44V6 apresentou-se expressa em 37 (48,7%) casos e sua perda

associou-se significativamente com a recidiva ($p=0,042$); Ezrina mostrou-se expressa em 8 (10,5%) casos e Moesina foi expressa em 33 (43,4%) casos. A relação Ezrina/CD44 mostrou-se superior a 100 em 32 (42,7%) casos e seu aumento associou-se significativamente ao tamanho do tumor ($p=0,015$) e à infiltração de corpo cavernoso ($p=0,049$); a relação Ezrina/CD44V6 mostrou-se superior a 100 em 30 (40%) casos, sendo que sua diminuição associou-se significativamente à recidiva ($p=0,018$); a relação Moesina/CD44 mostrou-se superior a 100 em 25 (33,3%) casos e sua diminuição associou-se significativamente com a recidiva ($p=0,006$); a relação Moesina/CD44V6 mostrou-se superior a 100 em 29 (38,7%) casos. Na relação Ezrina/CD44 a infiltração de corpo cavernoso foi o fator independente de risco para a recidiva. Conclusão: Embora o estudo tenha apresentado associações significativas com a recidiva, não se pode afirmar que isso seja decorrência da alteração ou não da adesão celular promovida pelo complexo CD44/ERM. Como a invasão tumoral parece estar relacionada com a modelagem da infiltração celular, isso seria melhor elucidado em um estudo levando-se em conta os aspectos funcionais das proteínas do complexo CD44/ERM.

SUMMARY

Andrade JB. **[Co-expression of CD44 and ERM family proteins (Ezrin/Moesin) in penile carcinoma]**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The loco regional involvement is considered the most severe complication and main cause of death in the natural history of penile carcinoma. The understanding of molecular processes that may be involved in the invasion mechanism and metastatic dissemination would improve the prognostic tools to a better patient evaluation, avoiding the morbidity of unnecessary surgery. Some studies have emphasized the influence of cellular adhesion in the tumor and metastatic development, being the complex CD44/ERM proteins (Ezrin/Radixin/Moesin), reported as involved in these processes. **Objectives:** To analyze the co-expression of CD44-Ezrin and CD44-Moesin in penile squamous cell carcinoma, correlating this co-expression to pathological clinical criteria. **Samples, Materials and Methods:** We retrospectively studied 76 patients undergoing surgery for penile squamous cell carcinoma at AC Camargo Cancer Center. The evaluation of CD44, CD44V6, Ezrin and Moesin individual expressions was performed by immunohistochemistry using the Ventana® equipment and the immunoreactivity of each protein was categorized as positive and negative. Co-expressions of Ezrin/CD44, Ezrin/CD44V6, Moesin/CD44 and Moesin/CD44V6 were manually evaluated by double staining immunohistochemistry and the immunoreactivities of ratios were categorized as more than 100 and less than 100. Subsequently, all immunoreactivities were analyzed by digital microscopy using the Aperio® ScanScope XT system. **Results:** The CD44 expression was observed in 5 (6.6%) cases; CD44V6 was expressed in 37 (48.7%) cases and its loss was significantly associated with recurrence ($p=0.042$); Ezrin was expressed in 8 (10.5%) cases and Moesin was expressed in 33 (43.4%) cases. The Ezrin/CD44 ratio was superior to 100 in 32 (42.7%) cases and its increase

was significantly associated with tumor size ($p=0.015$) and to the corpora cavernosa infiltration ($p=0.049$); the Ezrin/CD44V6 ratio was superior to 100 in 30 (40%) cases, and its decrease was significantly associated with recurrence ($p=0.018$); the Moesin/CD44 ratio was superior to 100 in 25 (33.3%) cases and its decrease was significantly associated with recurrence ($p=0.006$); the Moesin/CD44V6 ratio was superior to 100 in 29 (38.7%) cases. The corpora cavernosa infiltration was an independent risk factor for recurrence in the Ezrin/CD44 ratio. **Conclusion:** Although the study presents significant associations with recurrence, the alteration or not in the cellular adhesion caused by the CD44/ERM complex cannot be confirmed as a cause. As tumor invasion seems to be related to cellular infiltration modeling, it would be better elucidated by a study considering the functional aspects of the CD44/ERM complex proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama esquemático da estrutura gênica de CD44.....	9
Figura 2	Estrutura esquemática do complexo CD44/ERM.....	10
Figura 3	Desenho esquemático da conformação inativa e ativa de ERM...	14
Figura 4	Ilustração da plataforma Ventana [®] BenchMark XT (Roche, USA)..	22
Figura 5	Ilustração do sistema Aperio [®] ScanScopeXT (LeicaBiosystems)..	28
Figura 6	Ilustração do monitor do computador acoplado ao sistema Aperio Image Scope [®] com imagem escaneada a ser analisada.....	29
Figura 7	Imunorreatividades obtidas para CD44 em corte histológico de tecido prepucial normal.....	38
Figura 8	Imunorreatividades obtidas para CD44V6 em corte histológico de tecido prepucial normal.....	38
Figura 9	Imunorreatividades obtidas para Ezrina em corte histológico de tecido prepucial normal.....	39
Figura 10	Imunorreatividades obtidas para Moesina em corte histológico de tecido prepucial normal.....	39
Figura 11	Imagem ilustrando a transição entre o tumor e o PeIN, com imunorreatividade positiva de Moesina em região tumoral e imunorreatividade negativa de Moesina na região do epitélio normal.....	40

Figura 12	Imunorreatividade para Ezrina/CD44(HCAM) em corte histológico de tecido prepucial normal.....	41
Figura 13	Imunorreatividade para Ezrina/CD44V6 em corte histológico de tecido prepucial normal.....	42
Figura 14	Imunorreatividade para Moesina/CD44(HCAM) em corte histológico de tecido prepucial normal.....	42
Figura 15	Imunorreatividade para Moesina/CD44V6 em corte histológico de tecido prepucial normal.....	43
Figura 16	Imunorreatividades obtidas para CD44 em corte histológico de carcinoma epidermóide de pênis.....	44
Figura 17	Imunorreatividades obtidas para CD44V6 em corte histológico de carcinoma epidermóide de pênis.....	45
Figura 18	Imunorreatividades obtidas para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	45
Figura 19	Imunorreatividades obtidas para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	46
Figura 20	Curvas de Sobrevida Câncer Específica para os 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	56
Figura 21	Curvas de Sobrevida Livre de Doença para os 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	59
Figura 22	Curvas de Sobrevida Global para os 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	62

Figura 23	Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Ezrina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	65
Figura 24	Imunorreatividade superior a 100 obtida para Ezrina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	65
Figura 25	Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Ezrina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	66
Figura 26	Imunorreatividade superior a 100 obtida para Ezrina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	66
Figura 27	Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Moesina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	67
Figura 28	Imunorreatividade superior a 100 obtida para Moesina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	67
Figura 29	Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Moesina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	68
Figura 30	Imunorreatividade superior a 100 obtida para Moesina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	68
Figura 31	Curvas de Sobrevida Câncer Específica das relações para os 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	80

Figura 32	Curvas de Sobrevida Livre de Doença das relações para os 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	83
Figura 33	Curvas de Sobrevida Global das relações para os 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	86

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Frequência das variáveis demográficas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	33
Tabela 2	Frequência das variáveis clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcioma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	34
Tabela 3	Frequência das variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	36
Tabela 4	Imunorreatividade das proteínas estudadas de acordo com seus parâmetros obtidos no grupo controle de tecido prepucial normal do A.C.Camargo Cancer Center.....	37
Tabela 5	Média das relações obtidas das proteínas estudadas no grupo controle de tecido prepucial normal do A.C.Camargo Cancer Center.....	41
Tabela 6	Imunorreatividade das proteínas estudadas de acordo com seus parâmetros obtidos nos 76 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	44
Tabela 7	Imunorreatividade de CD44(HCAM) de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	47
Tabela 8	Imunorreatividade de CD44(HCAM) de acordo com as	48

variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....

Tabela 9	Imunorreatividade de CD44V6 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	49
Tabela 10	Imunorreatividade de CD44V6 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	50
Tabela 11	Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	51
Tabela 12	Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	52
Tabela 13	Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	53
Tabela 14	Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	54
Tabela 15	Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	57

Tabela 16	Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	60
Tabela 17	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Cente.....	63
Tabela 18	Relação de Ezrina com CD44(HCAM) e CD44V6 de acordo com seus parâmetros obtidos nos 75 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	64
Tabela 19	Relação de Moesina com CD44(HCAM) e CD44V6 de acordo com seus parâmetros obtidos nos 75 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	64
Tabela 20	Relação de Ezrina/CD44(HCAM) de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.....	69
Tabela 21	Relação de Ezrina/HCAM de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	70
Tabela 22	Relação de Ezrina/CD44V6 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	71

Tabela 23	Relação de Ezrina/CD44V6 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	72
Tabela 24	Relação de Moesina/CD44(HCAM) de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	73
Tabela 25	Relação de Moesina/CD44(HCAM) de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	74
Tabela 26	Relação de Moesina/CD44V6 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	75
Tabela 27	Relação de Moesina/CD44V6 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	76
Tabela 28	Fatores utilizados para a análise multivariada, para risco de recidiva na relação Ezrina/CD44(HCAM).....	77
Tabela 29	Fatores utilizados para a análise multivariada, para risco de recidiva na relação Moesina/CD44V6.....	77
Tabela 30	Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as relações imunoistoquímicas obtidas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	81

Tabela 31	Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as relações imunoistoquímicas obtidas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	84
Tabela 32	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as relações imunoistoquímicas obtidas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C.Camargo Cancer Center.....	87
Quadro 1	Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica para detecção isolada.....	22
Quadro 2	Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica com dupla marcação.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Ácido Hialurônico
Akt	Proteína quinase B
CCL	“cell conditioning”
CD44	“cluster of differentiation 44”
CD44s	“cluster of differentiation 44” “standard isoform”
CD44v	“cluster of differentiation 44” “variant isoform”
DAB	Diaminobenzidine
ECMR III	“extracellular matrix receptor III”
EGFR	“epidermal growth factor receptor”
EMT	“epithelial-mesenchymal transition”
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
ESCC	Células Escamosas do Esôfago
EUA	Estados Unidos da América
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCAM	“homing cell adhesion molecule”
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HPV	“human papillomavirus”
HRP	Enzima Horseradish Peroxidase
MEC	Matriz Extracelular
mTOR	“mammalian target of rapamycin”
p53	“tumor protein 53”
PBS	“phosphate buffered saline”
PGP-1	“phagocytic glycoprotein-1”
PI3-Kinase	“phosphoinositide-3-kinase”
RhoA	“Ras homolog gene family, member A”
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SPSS	Statistical Package for Social Science

SUS	Sistema Único de Saúde
TMA	“tissue microarray”
TNM	Classificação de Tumores Malignos TNM (T descreve o tamanho do tumor, N linfonodo regional e M metástases)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma de Pênis	1
1.2	Adesão celular e o Complexo CD44/ERM.....	7
1.3	O Complexo CD44/ERM no Carcinoma de Pênis	16
2	OBJETIVO GERAL	18
3	CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Critérios de Inclusão	20
3.2	Critérios de Exclusão.....	20
3.3	Imunoistoquímica	21
3.4	Microscopia Digital	27
3.5	Análise Estatística	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Aspectos Demográficos e Clínicos	32
4.2	Aspectos Anatomopatológicos	34
4.3	Estudo Imunoistoquímico	37
4.3.1	Avaliação Imunoistoquímica do Grupo Controle.....	37
4.3.2	Avaliação Isolada das Proteínas CD44, CD44V6, Ezrina e Moesina	43
4.3.2.1	Análise de Sobrevida	55
4.3.3	Avaliação das Relações das Proteínas Co-expressas	63
4.3.3.1	Análise de Sobrevida	78
5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÕES	96
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE PÊNIS

O carcinoma de Pênis é considerado uma doença rara nos países desenvolvidos e corresponde de 0,4 a 0,6% de todas as neoplasias. Nos Estados Unidos da América (EUA), sua incidência permaneceu estável nos últimos 25 anos, equivalendo-se a 0,2/100.000 habitantes (WATERHOUSE et al. 1982; PERCY et al. 1990; MOSCONI et al 2005; BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007). Segundo os dados do *National Cancer Institute*-NCI, a estimativa, em 2013, foi de 1570 novos casos de carcinoma de pênis e de 320 mortes decorrentes desta doença.

Em regiões da África, Ásia e América do Sul, consideradas pouco desenvolvidas ou em desenvolvimento, o carcinoma de pênis chega a corresponder a 20% das neoplasias malignas do homem (RAJU et al. 1985). Em regiões da Índia como Barshi, Paranda e Bhum ocorrem a sua maior incidência (3,32/100.000 habitantes). Já entre os judeus nascidos em Israel e nos EUA ocorrem os menores índices de sua incidência (0/100.000 habitantes e 0,07/100.000 habitantes, respectivamente) (BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007). Fazendo-se uma comparação entre indivíduos de classes sociais semelhantes, parece não haver distinção entre negros e brancos (VATANASAPT et al. 1995). Rara em crianças, a doença ocorre, particularmente, a partir da sexta década de vida, sendo pouco frequente em

adultos com idade inferior a 30 anos (DERRICK et al. 1973; NARASIMHARAO et al. 1985).

Embora não se tenham dados muito precisos sobre a epidemiologia deste tipo de tumor, trata-se de uma doença frequente no Brasil, correspondendo a 2% de todas as neoplasias malignas do homem, sendo mais incidente nas regiões Norte e Nordeste (BRUMINI 1982). Ainda que a doença apresente uma alta incidência em nosso meio, não há no Brasil um estudo epidemiológico multicêntrico realizado até este momento (FAVORITO et al. 2008).

Recentemente, em um inquérito voluntário entre seus associados, a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) comunicou 283 casos novos da doença no ano de 2006. Um dos dados encontrados mais relevantes foi a da sua ocorrência em pacientes jovens, já que 20% dos casos sucederam em pacientes abaixo dos 45 anos de idade, e destes, 7,5% dos casos sucederam em pacientes abaixo dos 35 anos de idade. Com relação ao estadio da doença, 58% corresponderam ao estadio avançado (T2-T4) da doença (FAVORITO et al. 2008).

Segundo dados do Data/SUS, o Sistema Único de Saúde (SUS) reembolsa cerca de 1000 penectomias por ano. Em 2007, no Maranhão, aconteceu a Campanha Nacional de Combate ao Câncer de Pênis, na qual foram realizadas 89 postectomias de pacientes com fimose e sem outras queixas e encontraram-se 15 casos de carcinomas incidentais (Calixto, informação pessoal). Embora estes dados sejam bastante elementares, confirmam a triste realidade do carcinoma de pênis no Brasil.

A ocorrência de fimose, más condições de higiene e baixo padrão socioeconômico são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença (PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; BRINTON et al. 1991).

Assim sendo, a circuncisão apresenta-se como um importante fator protetor nesta neoplasia, reportando aos aspectos religiosos e culturais um papel fundamental na sua incidência (JOHNSON et al 1973; FREW et al 1976). Nos judeus postectomizados ao nascimento, a incidência citada em alguns estudos chega a ser nula. Na Índia, nos mulçumanos postectomizados entre os três e os 12 anos de idade, a incidência é de 0,15%, enquanto que nos hindus não postectomizados, a incidência chega a 3,1% (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; LOPES et al. 1993).

A etiopatogenia do carcinoma de pênis, apesar de pouco conhecida, relaciona-se à infecção pelo papilomavírus humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*), ao número de parceiros sexuais e à exposição ao tabaco (BRINTON et al. 1991; HELLBERG et al. 1987; ROSEMBERG 1991). Dados recentes incluem a possibilidade da zoofilia também estar dentre os fatores envolvidos nesta neoplasia (ZEQUI et al. 2012).

O HPV afeta o epitélio escamoso dos órgãos sexuais masculinos da mesma maneira como afeta o epitélio escamoso dos órgãos sexuais femininos, incluindo-se a formação de condilomas e a transformação neoplásica. Cerca de 25% a 40% dos tumores associam-se à presença do HPV, sendo, usualmente, ligado aos tipos de alto grau histológico (JOHNSON et al. 1992; CHAUX et al. 2011). O HPV 6 e o HPV 11 são

comumente associados a lesões não displásicas, como verrugas genitais, por exemplo, podendo, também, estar associados ao carcinoma verrucoso. Os tipos 16, 18, 31 e 33 estão associados aos carcinomas *in situ* e invasivo (WIENER e WALTHER 1995), sendo que o HPV 16 é o mais recorrente na lesão primária, tendo sido referido em lesões metastáticas também (VARMA et al. 1991; IWASAWA et al. 1993).

Descreve-se o número de parceiros sexuais como fator de risco, provavelmente, pela sua associação direta com a infecção pelo HPV, já que sua positividade varia entre 31% e 63% nos casos de carcinoma de pênis. Esta variabilidade aponta a possibilidade de haver, ainda, outros fatores complementares envolvidos (WIENER et al. 1992; MADEN et al. 1993).

Normalmente, a doença manifesta-se como uma lesão na glândula, que, se não tratada adequadamente, estende-se para o prepúcio e para o corpo, invadindo, dessa forma, corpos cavernosos e uretra, podendo chegar à auto amputação. Suas vias de disseminação precoce acontecem através das metástases linfonodais que migram para a região femoral e ilíaca (PERSKY e DEKERNION 1986; NARAYANA et al. 1993). As metástases por via hematogênica são raras, acometendo menos de 3% dos casos (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978). As principais causas de morte, nos casos mais avançados, são a hemorragia e a septicemia, como consequências de complicações loco-regionais, com o tumor infiltrando o feixe vâsculo-nervoso (PURAS et al. 1978; POMPEU 1993).

Assim sendo, o acometimento loco-regional representa a maior complicação do carcinoma peniano. A presença de linfonodos palpáveis ao

diagnóstico varia de 20% a 96% dos casos (SUFKIN e HUBEN 1987) e cerca de 50% dos linfonodos inguinais com suspeita clínica não apresentam comprometimento tumoral. Nestas condições, a linfonodomegalia ocorre como consequência de infecção associada ao tumor primário (BEGGS e SPRATT 1964; CATALONA 1980; LOPES et al. 1996). Em contrapartida 20% dos pacientes com linfonodos clinicamente negativos apresentam metástases microscópicas (BEGGS e SPATT 1964; DEKERNION et al. 1973). Levando-se em conta a morbidade da linfadenectomia inguinal e ilíaca, este índice elevado de falso-positivos e de falso-negativos diagnosticados pelo exame clínico corresponde à maior problemática da conduta terapêutica do carcinoma de pênis. Portanto, a determinação de fatores de risco para metástase linfonodal e a criação de um nomograma prognóstico torna-se mandatório para que pacientes não sofram disseções inguino-ilíacas desnecessárias.

Cerca de 95% dos casos de carcinoma de pênis são constituídos por carcinomas derivados do epitélio pluriestratificado, tanto da glândula como do sulco coronal e do prepúcio (CUBILLA et al. 1993; VELAZQUEZ e CUBILLA 2007). Destes, 70% são carcinomas epidermóides do tipo usual (CUBILLA et al. 2004) e os outros 30% são variantes como o carcinoma basalóide, o carcinoma adeno-escamoso (CUBILLA et al. 1996), o carcinoma acantolítico (CUNHA et al. 2009), o carcinoma sarcomatóide (VELAZQUEZ et al. 2005) e outras variantes mais raras. Estas variantes ainda apresentam um reconhecimento bastante deficiente e, em trabalho recente, nosso grupo validou a importância do reconhecimento destes tipos especiais de

carcinoma (GUIMARÃES et al. 2009). Um outro conjunto de tumores apresenta um padrão exofítico de crescimento e compreende o carcinoma verrucoso (VELAZQUEZ et al. 2007), o carcinoma condilomatoso (“wharty”), o carcinoma epidermóide papilífero (CHAUX et al. 2010b), e o carcinoma condilomatoso-basalóide (CHAUX et al. 2010a).

Os dados morfológicos, bem como a classificação correta do subtipo histológico, podem dar informações valiosas em relação ao comportamento biológico do tumor. Dentre estes dados, pode-se destacar o grau histológico do tumor (VELAZQUEZ et al. 2008), a invasão vascular (GUIMARÃES et al. 2009), a invasão perineural (VELAZQUEZ et al. 2008) e o padrão do fronte de invasão do tumor (GUIMARÃES et al. 2006). Todos estes aspectos são importantes na predição das metástases linfonodais e da sobrevida do paciente.

Apesar dos fatores morfológicos serem de extrema importância para a criação de nomogramas preditivos de metástases linfonodais, o conhecimento dos aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento do tumor também pode ser de grande valia, neste sentido e para o prognóstico da doença. O estudo de fatores biomoleculares deve ampliar as ferramentas disponíveis para uma melhor avaliação dos pacientes, permitindo, assim, um planejamento terapêutico mais adequado e evitando-se a morbidade de cirurgias desnecessárias. Ainda hoje, mesmo com o desenvolvimento de alguns estudos, pouco se sabe sobre estes fatores no carcinoma peniano, podendo-se destacar a expressão de p53 (LOPES et al. 2002), a perda da expressão de E-caderina (CAMPOS et al. 2006), a expressão de

metaloproteases 2 e 9 (CAMPOS et al. 2006; SOARES et al. 2006), o índice proliferativo (GUIMARÃES et al. 2007) e a amplificação de EGFR (SILVA 2010).

1.2 ADESÃO CELULAR E O COMPLEXO CD44/ERM

A matriz extracelular é uma rede complexa de macromoléculas extracelulares secretadas, que têm como função principal a sustentação da célula. Ela auxilia a união de células e tecidos e propicia um ambiente organizado nos quais as células migratórias podem mover-se e interagir umas com as outras de maneira ordenada (ALBERTS et al. 2004).

Uma das características mais marcantes dos epitélios é a adesão intercelular. Os estratos epiteliais têm contato com um tipo especial de matriz extracelular (MEC), a lâmina basal, e a quebra da adesão célula epitelial-MEC é pré-requisito para invasão tumoral e metástases. As células estão ligadas umas às outras por adesões célula-célula, as quais suportam grande parte do estresse mecânico. O citoesqueleto citoplasmático da célula epitelial liga-se às junções especializadas na membrana citoplasmática, que mantêm as superfícies de células adjacentes unidas umas às outras ou célula à matriz extracelular (ALBERTS et al. 2004).

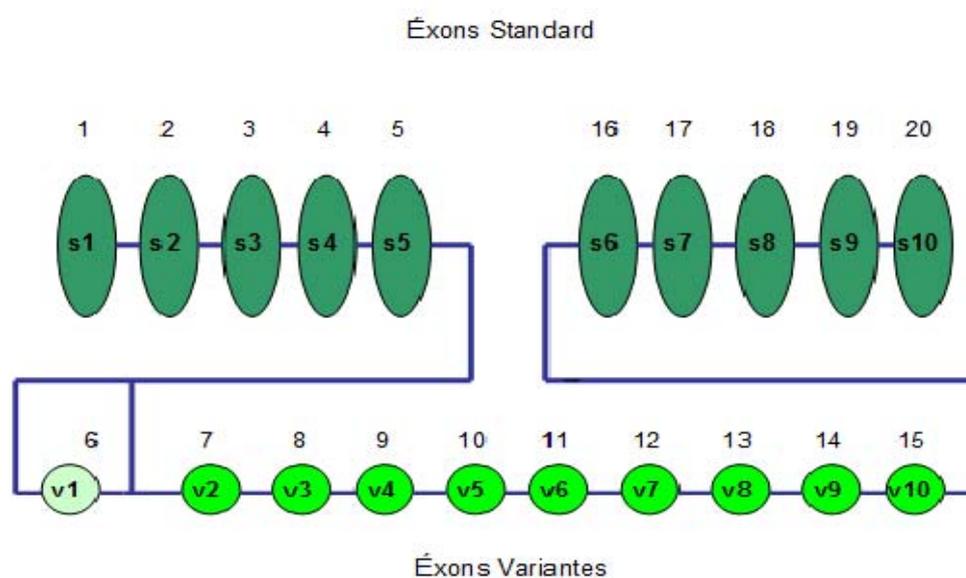
A adesão entre as células epiteliais é um fenômeno fundamental para a manutenção da homeostasia do tecido. Esta adesão ocorre em quatro diferentes complexos celulares: junções aderentes (*tight junctions*), desmossomos, zônula oclusiva e junção comunicante (gap junction), cada

uma delas com funções distintas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1997). Cada um destes tipos de adesões tem seus representantes principais, como as caderinas nas junções aderentes, as claudinas nas zônula oclusiva, as desmoplaquinas nas placas desmossômicas e as conexinas nas junções comunicantes.

A propriedade das células malignas em alterar a sua adesão a outras células e à matriz extracelular faz parte dos mecanismos básicos mais importantes da biologia celular do tumor. Isso promove o potencial das células tumorais em se desprenderem do seu sítio original de crescimento e, dessa forma, invadir tecidos adjacentes através do processo conhecido como metástase.

Uma das proteínas de adesão mais estudadas em tumores é a CD44 (HCAM) e suas variantes. Estas proteínas sofrem mudanças estruturais e funcionais dramáticas durante a transformação maligna dos tumores em geral. A CD44 é o produto de um único gene (GOODFELLOW et al. 1982), localizado no braço curto do cromossomo 11 e representa uma família de glicoproteínas transmembranas receptoras de hialuronato (ácido hialurônico), envolvida na interação célula-célula e célula-matriz extracelular (RUDZKI e JOTHY 1997; GOODISON et al. 1999). Pode também ser chamada de PGP-1 (phagocytic glycoprotein) (ZHOU et al. 1989), HCAM (hyaluronate receptors) (GOLDSTEIN et al. 1989), Hermes antigen (JALKANEN et al. 1986) ou ECMR III (extracellular matrix receptor III) (WAYNER et al. 1988). A sua estrutura é composta por 20 éxons, dos quais 10 deles (V1-V10) são éxons variantes, que combinados de formas

diferentes através de *splicing* alternativo, inserem-se no domínio extracelular. Teoricamente, mais de 700 isoformas diferentes podem ser geradas (VAN WEERING et al. 1993), mas aproximadamente 20 delas têm sido descritas em tecidos e linhagens celulares. Os outros 10 éxons restantes (S1-S10) representam a isoforma *standard* (GOODFELLOW et al. 1982). (Figura 1)



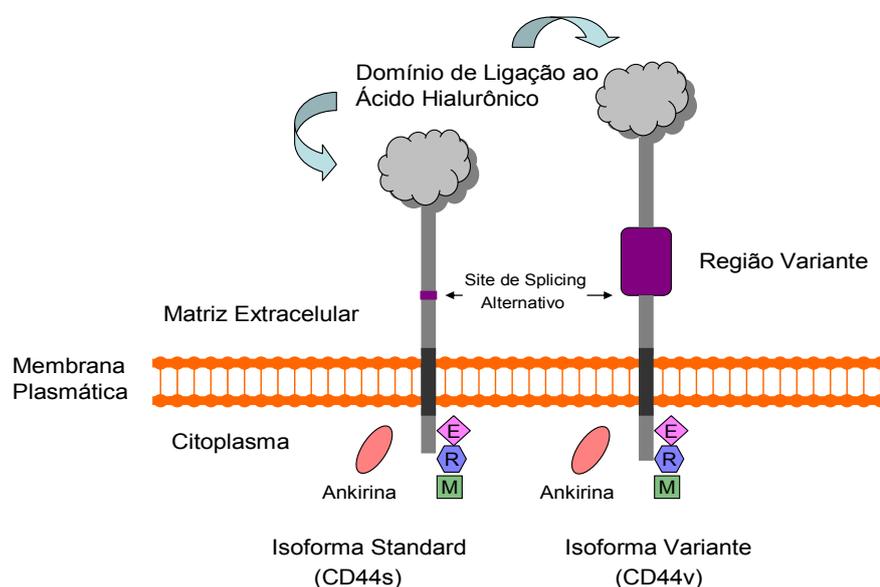
Legenda: O éxon de número 6 (V1) representa um stop códon e normalmente não está incluso no CD mRNA humano.

Fonte: Adaptado de GOODISON et al. (1999).

Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura gênica de CD44.

A família CD44 é expressa constitutivamente em células epiteliais e em linfócitos ativos. Sua porção N-terminal do domínio extracelular liga-se ao ácido hialurônico (AH) e sua porção citoplasmática liga-se à ankirina e à família ERM (do inglês Ezrin/Radixin/Moesin), ambos responsáveis pela ligação ao citoesqueleto (RUDZKI e JOTHY 1997). (Figura 2) Estudos *in*

vitro indicaram que a modificação da expressão de CD44 resulta num ligante diferente de receptor e isso influencia a motilidade celular, as propriedades invasivas e o potencial metastático do tumor, já que se rompe a interação normal epitélio mesênquima, contribuindo, assim, para a desorganização estrutural e funcional presente no câncer (GOODFELLOW et al. 1982; GOODISON et al. 1999).



Legenda: Interação da molécula de CD44 com o citoesqueleto através da ligação com a ankirina e a família ERM no citoplasma

Fonte: Adaptado de GOODISON et al. (1999).

Figura 2 - Estrutura esquemática do complexo CD44/ERM.

A ligação entre o ácido hialurônico e CD44 pode iniciar uma série de eventos que começam com a modificação da adesão à matriz extracelular e continua com a ativação de outras moléculas como: fatores de crescimento, degradação da matriz, angiogênese, permeabilidade vascular e

extravasamento, passos necessários para a iniciação do processo metastático (ARSLAN et al. 2012).

STAMENKOVIC et al. (1989; 1991) mostraram em seus estudos, que os tecidos tumorais apresentam superexpressão de CD44 em relação ao tecido normal correspondente (STAMENKOVIC et al. 1989; 1991). Isso comprova a ideia de que a expressão de várias isoformas de CD44 pode influenciar na tumorigênese e no processo metastático. A primeira evidência envolvendo CD44 no processo de metástase foi a identificação de CD44v contendo éxons V4-V7 em células de carcinoma pancreático de rato, altamente metastizado (GÜNTHERT et al. 1991).

A superexpressão das variantes de CD44V4-V7 e CD44V6-V9 em vários tipos de câncer, assim como a diminuição da expressão de CD44S em câncer colorretal, sugerem um aumento da tumorigênese, o que enfatiza a importância do estudo de CD44 no câncer (GÜNTHERT et al. 1991; ISHIBASHI et al. 1995; OCHIAI et al. 1997; KUROZUMI et al. 1998; NAOR et al. 1998; FOEKENS et al. 1999; CHOI et al. 2000; ISHIDA 2000; AYHAN et al. 2001; MISRA et al. 2001).

Muitas isoformas variantes, especialmente aquelas contendo seqüências de V6-V10, são altamente expressas nas neoplasias humanas (RUDZKI e JOTHY 1997). As isoformas contendo seqüências da variante V1 não têm sido identificadas em tecidos humanos, provavelmente, por V1 possuir um stop códon (SCREATON et al. 1993).

Os diversos estudos demonstraram que em diferentes tipos de câncer mais de uma isoforma pode estar envolvida na progressão tumoral. Em

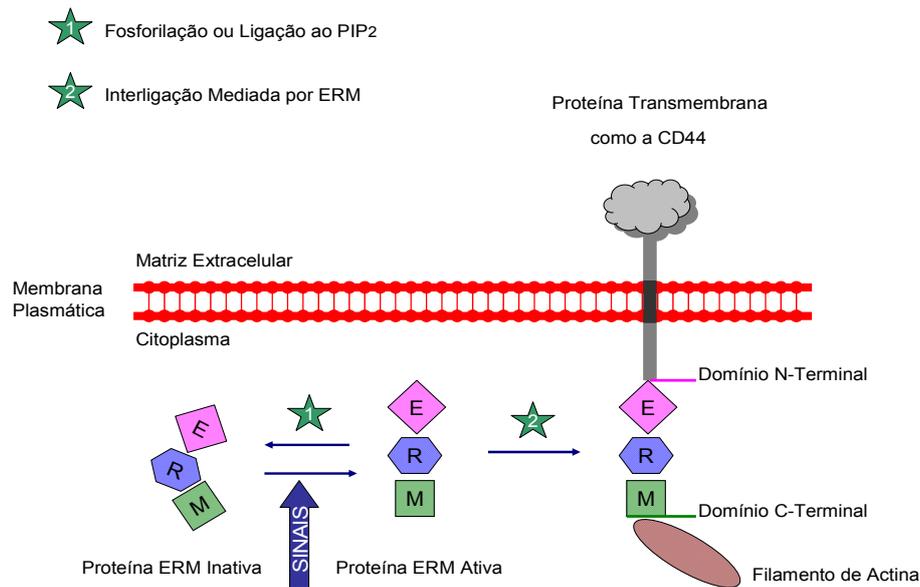
linfomas observou-se alta expressão das variantes V3, V6 e V9 (KOOPMAN et al. 1993; TERPE et al. 1994). A variante V5 é encontrada com expressão elevada em melanomas, porém melanócitos não neoplásicos não apresentam isoformas variantes, apenas o HCAM (HOFMANN et al. 1991; MANTEN-HORST et al. 1995). Todas as variantes das isoformas de CD44 estão presentes, tanto em adenomas como em carcinomas do cólon (KIM et al. 1994). A elevada expressão de V6 está, frequentemente, associada aos diversos achados clínicos e morfológicos, como, por exemplo, a metástase linfonodal (RUDZKI e JOTHY 1997).

A variante CD44V6 tem atraído um grande interesse desde que se demonstrou o seu potencial metastático em células não metastáticas de linhagem tumoral de ratos (GÜNTHERT et al. 1991). As metástases linfonodais associadas à carcinoma de células escamosas demonstram elevada expressão de CD44V6. A alta expressão foi frequente em tumores derivados de cabeça e pescoço, esôfago, pele e pulmão, onde a maioria dos autores reportaram frequências superiores a 90%. Assim, isoformas contendo o éxon V6 têm sido vistas como excelentes marcadores para a terapia anticâncer (SCREATON et al. 1993).

De acordo com TRAPASSO e ALLEGRA (2012), estudos mostram que CD44 é um importante biomarcador de uma subpopulação celular, as células tronco do câncer, que são capazes de autorrenovação, além de terem a capacidade de iniciação, progressão, invasão, metástase, recidiva e resistência à quimioterapia e à radioterapia.

O ligante citoplasmático do CD44 é a família ERM. A família ERM corresponde a três proteínas encontradas de forma independente em vários tecidos e células, a Ezrina, a Radixina e a Moesina. Todas elas atuam na ligação dos filamentos de actina à membrana plasmática. A Ezrina é constituinte das microvilosidades (BRETSCHER 1983; PAKKANEN et al. 1987). A Radixina é uma proteína envolvida na modulação da actina na junção aderente célula-célula (TSUKITA et al. 1989) e a Moesina é um ligante da heparina (LANKES et al. 1988).

O domínio c-terminal das proteínas ERM liga-se diretamente à lateral dos filamentos de actina, enquanto que o domínio n-terminal liga-se à face citoplasmática de várias glicoproteínas transmembranas, como é o caso da CD44. A família ERM pode existir na forma ativa, estendida, que oligomeriza e liga a actina à glicoproteína transmembrana; e na forma inativa, dobrada. (Figura 3)



Legenda: O desdobramento regulado de uma proteína ERM, devido à fosforilação ou à ligação com PIP2, expõe dois sítios de ligação, um para o filamento de actina e outro para a proteína transmembrana.

Fonte: Adaptado de ALBERTS et al. (2004).

Figura 3 - Desenho esquemático da conformação inativa e ativa de ERM

Embora ERMs sejam conhecidas por organizarem o citoesqueleto cortical, também coordenam diversos eventos de sinalização celular através de sua habilidade de fixar componentes localizados no domínio apical da célula (KOOPMAN et al. 1993).

HARRISON et al. (2002) estudaram a expressão da interação CD44/Ezrina, membro da família de proteínas ERM, no câncer de próstata, e concluíram que tal complexo desempenha um papel importante no processo de migração celular e metástase, já que interagem com as células endoteliais nas áreas de contato entre o tumor e o endotélio (HARRISON et al. 2002). Enfatizando esse achado, MARTIN et al. (2003) relatam que o complexo CD44/Ezrina tem propriedades que sugerem a sua importância no

processo de interação tumor-endotélio, migração celular, adesão celular, progressão tumoral e metástase (MARTIN et al. 2003). Segundo eles, o aumento na expressão de CD44 leva a um aumento funcional da ativação de Ezrina. Assim, os membros da família ERM têm sido alvos não somente de estudos sobre a sua atuação nos filamentos de actina, mas também de estudos envolvendo adesão e crescimento celular (TSUKITA et al. 1994). Nosso grupo, recentemente, demonstrou a importância da expressão de Ezrina no carcinoma de cólon (PATARA et al. 2011) e no adenocarcinoma de próstata (PINTO et al. dados ainda não publicados).

Em estudo desenvolvido para investigar as expressões de Ezrina e E-caderina e suas relações com fatores clínicopatológicos no carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC), observou-se que a expressão de Ezrina associou-se significativamente com a invasão tumoral e com a metástase linfonodal, bem como com a baixa expressão de E-caderina (ZHAI et al. 2010), demonstrando que o aumento da expressão de Ezrina e a diminuição/ausência da expressão de E-caderina contribuem para o processo tumoral e metastático do ESCC. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo de carcinoma hepatocelular (HCC), onde a forte expressão de Ezrina associou-se significativamente com o estágio avançado do tumor, invasão tumoral, recorrência do tumor e com outros fatores prognósticos ruins (KANG et al. 2010).

No mixofibrosarcoma primário, a superexpressão de Ezrina mostrou-se como um elemento prognóstico importante. Observou-se que a elevada expressão da proteína promove a progressão da doença, bem como

metástase, já que se associa significativamente com variáveis relativas à agressão tumoral (HUANG et al. 2010).

No câncer retal, estudaram-se as implicações da expressão de Ezrina em casos que foram tratados previamente com radioterapia. O prognóstico de pacientes com expressão negativa/fraca de Ezrina, na biópsia pré-tratamento, foi significativamente melhor do que em pacientes com expressão moderada/forte. No grupo da radioterapia de longo curso, a expressão negativa/fraca de Ezrina foi associada à regressão do tumor (KORKEILA et al. 2010).

A Ezrina também desempenha um papel fundamental na sinalização do receptor do fator de crescimento e regula várias vias de sinalização celular, incluindo a via PI3K/AKT/mTOR, que promove a sobrevivência celular (ARSLAN et al. 2012).

Esses dados só vêm enfatizar o que um número crescente de publicações tem sugerido, a possibilidade do uso clínico da Ezrina como biomarcador prognóstico e metastático nos mais variados tipos de câncer.

1.3 O COMPLEXO CD44/ERM NO CARCINOMA DE PÊNIS

Em toda a revisão de literatura realizada, não foram identificados trabalhos sobre a integridade do complexo CD44/ERM no carcinoma de pênis. Este foi o motivo da dissertação de mestrado intitulada “Correlação clínico-patológica da expressão protéica do complexo CD44/ERM (Ezrina, Radixina e Moesina) no carcinoma de pênis”, no qual se avaliaram as

expressões protéicas de CD44 e da família ERM (Ezrina, Radixina e Moesina), de forma isolada, correlacionando-as ao quadro clínico-patológico e ao comportamento clínico de pacientes portadores de carcinoma de pênis (ANDRADE 2009).

Dentre os resultados de maior relevância, com as variáveis estudadas, observou-se que a expressão diminuída de CD44 teve uma associação significativa com a invasão perineural e com a infiltração de corpo cavernoso, critérios sabidamente de importância prognóstica (VELAZQUEZ et al. 2008). Com um comportamento inverso, a expressão positiva de Ezrina associou-se significativamente com a postectomia e com o grau de diferenciação histológica do tumor, e a expressão de Moesina associou-se significativamente com a raça e com a postectomia. Não houve nenhum tipo de associação significativa com a expressão de Radixina.

Não foi observada nenhuma associação significativa entre as variáveis imunoistoquímicas avaliadas e a presença de metástases linfonodais, assim como nenhuma delas influenciou significativamente a sobrevida câncer específica e a sobrevida global. A expressão de Ezrina teve uma influência significativa na sobrevida livre de doença.

Este estudo, embora informativo, não interessou à pergunta sobre a integridade do complexo CD44/ERM. Em outras palavras, a análise isolada dos componentes mostrou que há alterações importantes na expressão do complexo CD44/ERM e que tem implicações prognósticas. Entretanto, uma informação mais relevante seria entender como a co-expressão da proteína CD44 e a Ezrina/Moesina estão representadas no carcinoma epidermóide de pênis.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar a co-expressão de CD44-Ezrina e de CD44-Moesina no carcinoma epidermóide de pênis, correlacionando esta co-expressão aos parâmetros clínico-patológicos.

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, onde foram selecionados pacientes submetidos à cirurgia para carcinoma epidermóide de pênis, com ou sem linfadenectomia ínguino-ílica, no A.C.Camargo Cancer Center, dentre o período compreendido entre janeiro de 1953 a dezembro de 2006.

Foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica todos os blocos de parafina referentes aos pacientes previamente selecionados e passíveis de confirmação diagnóstica, perfazendo um total de 210 casos. Os registros dos pacientes foram obtidos através do arquivo do próprio Departamento de Anatomia Patológica.

Os dados clínico-patológicos dos casos analisados foram recuperados a partir do banco de dados já revisado anteriormente pelo grupo de estudos do câncer de pênis, cujos aspectos já estão publicados (GUIMARÃES et al. 2009; 2011).

Foram estudados os 100 casos onde se tinha o corte do tumor incluído da superfície até o seu ponto mais profundo, a fim de se analisar o fronte de invasão. Estes casos foram obtidos a partir dos blocos do banco de tumores, de onde se tinham os 210 casos inicialmente selecionados.

Através destes blocos foram confeccionados cortes histológicos colhidos em lâminas eletricamente carregadas, para se evitar o descolamento dos mesmos, onde, posteriormente, realizaram-se colorações

imunoistoquímicas para as proteínas CD44, CD44V6, Ezrina e Moesina com a finalidade de serem avaliadas tanto isoladamente como co-expressas.

Como grupo controle de tecido normal foram utilizados 10 casos de material prepucial proveniente de postectomias por fimose, de pacientes jovens, com idade inferior a 20 anos, sem nenhuma condição patológica conhecida e sem lesões penianas.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Casos de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis, submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário e à linfadenectomia regional, uni ou bilateral, em qualquer momento do seu seguimento, ou pacientes que tenham seguimento adequado por pelo menos cinco anos, ou com evento final antes deste período.
- Casos que tenham material arquivado suficiente para novos cortes histológicos para a execução do estudo imunoistoquímico e que cujos cortes tenham sido incluídos de modo a se observar a superfície do tumor até o seu fronte de invasão.

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes que apresentaram segundo tumor primário.
- Pacientes que tenham realizado tratamento adjuvante ou neoadjuvante.

3.3 IMUNOISTOQUÍMICA

Inicialmente, a partir dos 100 casos selecionados, foram realizadas reações de imunistoquímica para a detecção isolada de CD44(HCAM), CD44V6, Ezrina e Moesina nos cortes histológicos já construídos previamente pelo Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, com os respectivos materiais devidamente arquivados em parafina.

O método de imunistoquímica para a detecção isolada de cada um dos anticorpos estudados foi desenvolvido através da plataforma BenchMark XT da Ventana[®] (Roche, USA) (Figura 4) e seguiu o seguinte protocolo:

- 60 minutos para CCL (cell conditioning) – recuperação antigênica
- 32 minutos para incubação do anticorpo
- 8 minutos para Hematoxilina
- 4 minutos para o Bluing



Figura 4 - Ilustração da plataforma Ventana® BenchMark XT (Roche, USA).

As especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas estão ilustradas no quadro abaixo:

Quadro 1 - Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica para detecção isolada.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Controle Positivo	Diluição
CD44 (HCAM)	DF1485	Leica Biosystems	Tonsila	1:50
CD44V6	VFF-7	Leica Biosystems	Tonsila	1:100
Ezrina	3C12	Lab Vision Corporation	Pulmão	1:25
Moesina	38/87	Lab Vision Corporation	Placenta	1:1200

Embora estes marcadores já tenham sido anteriormente avaliados, isoladamente, na dissertação de mestrado, a repetição foi feita levando-se em conta que no primeiro experimento foram realizadas em cortes de arranjo de tecido em matriz (TMA, do inglês *tissue microarray*) e não em cortes totais. Como o propósito agora era também avaliar o seu fronte de invasão, estas novas colorações foram mandatórias.

Posteriormente, nos mesmos 100 casos selecionados, as co-expressões de CD44-Ezrina, CD44-Moesina, CD44V6-Ezrina e CD44V6-Moesina foram avaliadas por colorações imunoistoquímicas cromogênicas de dupla marcação.

O método de imunoistoquímica aplicado para a dupla marcação seguiu o protocolo utilizado na rotina do A.C. Camargo Cancer Center e compreendeu os seguintes passos:

- Desparafinização: banham-se as lâminas de TMA em xilol por três vezes de cinco minutos cada; em seguida banham-se, rapidamente, as lâminas por quatro vezes em álcool absoluto e em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.
- Recuperação Antigênica: todos os anticorpos analisados foram padronizados utilizando-se solução de citrato (pH 6,0) e panela de pressão Pascal (DakoCytomation®). Colocam-se as lâminas no borel com solução de citrato dentro da panela de pressão com 500 ml de água destilada em seu interior marcando o tempo de 30 minutos. Depois de desligada a panela, retira-se o borel para esfriar em

temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.

- Bloqueio de proteína (peroxidase endógena): banham-se as lâminas com H₂O₂ (10 volumes) por três vezes de cinco minutos cada. Em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.
- Bloqueio de proteínas inespecíficas: utiliza-se o bloqueador de proteína Kit Dako[®] Protein serum-free. Secam-se as lâminas e circula-se o corte tecidual de cada uma delas com caneta de silicone; incubam-se 100 µl do bloqueador por 20 minutos em câmara úmida.
- Incubação com o primeiro anticorpo primário: dilui-se cada anticorpo com o diluente da Dako[®] (Antibody Diluent with Background Reducing Component) de acordo com a proporção padronizada para cada um deles; incuba-se 100 µl do anticorpo diluído em cada lâmina por duas horas em câmara úmida; lavam-se as lâminas com piseta contendo PBS 1X. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada.
- Incubação com o anticorpo secundário: todos os anticorpos foram padronizados para incubação com o kit Advance[™] (Dako[®]). Incuba-se 100 µl do advance link HRP em cada lâmina por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada. Incuba-se, então 100 µl do advance enzyme HRP em cada lâmina por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada.

- Coloração: dilui-se o reagente DAB na proporção 1:50; incuba-se 100 µl do DAB em cada lâmina por cinco minutos tomando-se o cuidado de retirá-lo antes do término do tempo caso o corte tecidual fique muito escuro; passam-se as lâminas rapidamente em água para retirar o DAB, colocando-as em água limpa dentro de um borel; em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.
- Incubação com o segundo anticorpo primário: dilui-se cada anticorpo com o diluente da Dako[®] (Antibody Diluent with Background Reducing Component) de acordo com a proporção padronizada para cada um deles; incuba-se 100 µl do anticorpo diluído em cada lâmina “overnight” em câmara úmida; lavam-se as lâminas com piseta contendo PBS 1X. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada.
- Incubação com o anticorpo secundário: todos os anticorpos foram padronizados para incubação com o kit EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red) (Dako[®]). Incuba-se 100 µl do Rabbit/Mouse link em cada lâmina por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada. Incuba-se, então 100 µl do AP enzyme (Enhancer) em cada lâmina por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada.
- Coloração: dilui-se o reagente Permanent Red Chromogen no Substrate Buffer na proporção 1:100; incuba-se 100 µl do Permanent Red em cada lâmina por 10 minutos; passam-se as lâminas

rapidamente em água para retirar o Permanent Red, colocando-as em água limpa dentro de um borel; em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos; incubam-se as lâminas em hematoxilina por dois minutos; lavam-se as lâminas em água para tirar o excesso da hematoxilina; passam-se, rapidamente, as lâminas pelo diferenciador (álcool 50% + ácido clorídrico). Em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.

- Montagem das lâminas: após a secagem das lâminas, pinga-se uma gota de meio de montagem aquoso (EasyPach®) em cada uma delas, cobrindo-as com lamínula.

Os anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas de dupla marcação foram o CD44(HCAM), CD44V6, Ezrina e Moesina, com suas especificações ilustradas no Quadro abaixo:

Quadro 2 - Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica com dupla marcação.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Controle Positivo	Diluição	Coloração
CD44 (HCAM)	DF1485	Leica Biosystems	Tonsila	1:40	Permanent Red
CD44V6	VFF-7	Leica Biosystems	Tonsila	1:500	Permanent Red
Ezrina	3C12	Lab Vision Corporation	Pulmão	1:500	DAB
Moesina	38/87	Lab Vision Corporation	Placenta	1:200	DAB

3.4 MICROSCOPIA DIGITAL

Para a avaliação das expressões proteicas de CD44(HCAM), CD44V6, Ezrina e Moesina levaram-se em consideração a intensidade da reação, bem como a localização celular da proteína.

A análise foi realizada através de microscopia digital por meio do sistema Aperio® ScanScope XT (Leica Biosystems). (Figura 5) Este sistema reconhece com rapidez e sensibilidade centenas de níveis de intensidade das reações imunoistoquímicas e as converte em uma escala de valores percentuais de acordo com as colorações obtidas. O sistema permite o escaneamento de menos de duas lâminas por minuto a uma magnificação de 20X, podendo duplicá-la para uma magnificação de 40X o que permite excluir debris celulares, além de detectar, contar e classificar as células baseadas na cor, forma e tamanho das mesmas.

As vantagens da análise automatizada estão no fato de permitir a conversão do método semiquantitativo em quantitativo, aumentar a objetividade e a reprodutibilidade, e na acurácia do método.



Figura 5 - Ilustração do sistema Aperio® ScanScope XT (Leica Biosystems).

Tanto as lâminas dos 100 casos avaliados por imunohistoquímica isolada, quanto as lâminas dos 100 casos avaliados por imunohistoquímica de dupla marcação foram escaneadas pelo sistema Aperio® e digitalizadas num banco de imagens. Por meio do software Aperio ImageScope® e de um monitor de computador (Figura 6) as imagens foram geradas e analisadas pelos autores, que selecionaram diferentes áreas da amostra, conforme a região tumoral. O programa leu estas áreas selecionadas e quantificou numericamente a intensidade de coloração dos anticorpos. A intensidade final da reação de cada caso foi calculada através da média das intensidades das reações das áreas selecionadas. Para a análise dos anticorpos isolados foi utilizado o algoritmo Membrana v1 e para a análise dos anticorpos co-expressos utilizou-se o algoritmo Color Deconvolution v9.

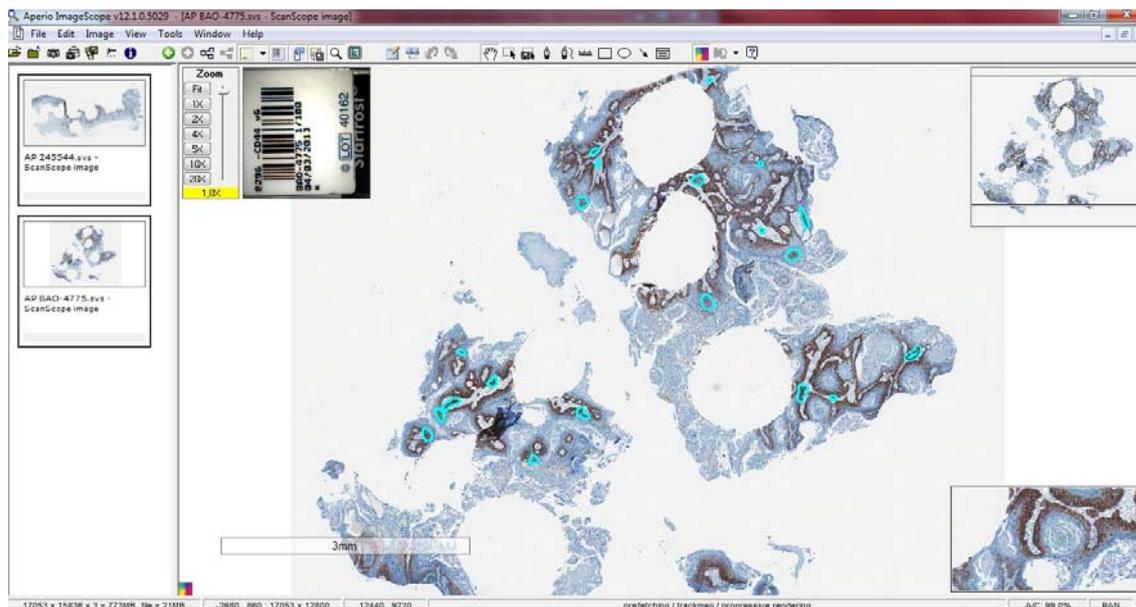


Figura 6 - Ilustração do monitor do computador acoplado ao sistema Aperio ImageScope® com imagem escaneada a ser analisada.

De posse dos valores obtidos, no grupo controle, para a imunorreatividade de cada proteína em estudo, tanto isoladamente como co-expressas, foram estabelecidos valores de cut-off com o intuito de categorizar estas proteínas a serem avaliadas. Para tanto, nas proteínas isoladas, calculou-se a mediana, quando aplicável, dos valores obtidos para os 10 casos analisados. Estabeleceu-se, então, que tanto para CD44(HCAM), como para Ezrina, as imunorreatividades com valores de intensidade acima de 3% seriam consideradas positivas e abaixo disso, negativas. Para CD44V6, ficou estabelecido que imunorreatividades com valores de intensidade acima de 20% seriam consideradas positivas e abaixo disso, negativas. Já para Moesina, estabeleceu-se que imunorreatividades com valores de intensidade acima de 10% seriam consideradas positivas e abaixo disso, negativas.

Já para as proteínas co-expressas, o cut-off foi estabelecido através da determinação das médias das relações obtidas Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6. Assim, estipulou-se que essas relações Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6 seriam categorizadas em inferior a 100 (<100) e superior a 100 (>100).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações coletadas foram armazenadas num banco de dados informatizado e analisadas através do programa Statistical Package for Social Science – SPSS (versão 21.0).

As descrições da população e das variáveis do estudo foram realizadas por meio de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mediana e porcentagens). As variáveis imunoistoquímicas CD44(HCAM), CD44V6, Ezrina e Moesina foram categorizadas em negativa e positiva; as relações Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6 foram categorizadas em inferior a 100 (<100) e superior a 100 (>100).

Verificou-se a associação entre a expressão dos marcadores biomoleculares e as diversas variáveis do estudo por meio do teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência.

Para o cálculo das probabilidades de sobrevida global (SG), considerou-se o intervalo de tempo transcorrido entre a data da cirurgia e a data do óbito ou do último seguimento. Para a sobrevida livre de doença (SLD), considerou-se o tempo transcorrido até a data da recorrência da doença. A estimativa da sobrevida livre de doença foi realizada apenas para os pacientes sem metástases linfonodais na admissão e aqueles cujas margens cirúrgicas macroscópicas foram consideradas sem doença. As taxas de sobrevida foram calculadas pelo estimador produto limite de Kaplan-Méier, sendo as curvas comparadas pelo teste de Log-rank. As variáveis com nível descritivo do teste de até 0,200 e cujos riscos eram proporcionais ao longo do tempo foram selecionadas para a análise multivariada, a qual foi realizada pelo modelo de risco proporcional de Cox. Avaliou-se a proporcionalidade de riscos por meio de gráficos $\ln - \ln [S(t)]$.

Pacientes que não compareceram às consultas ou sem informações por um período superior a duas vezes os estipulados para retorno foram considerados perdidos de seguimento na data da última informação. Esses pacientes contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo, então, considerados sob censura.

4 RESULTADOS

Dos 100 casos selecionados para a análise imunoistoquímica, um total de 76 pacientes (76,0%) com carcinoma de pênis pôde ser avaliado de maneira completa quanto aos dados clínicos, epidemiológicos, anatomopatológicos e imunoistoquímicos, sendo esta a casuística final do estudo.

4.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Os 76 pacientes foram categorizados, quanto à idade, em menores de 60 anos e maiores de 60 anos, idade esta considerada pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela Organização Mundial da Saúde como definição para idosos em países em desenvolvimento.

Deste modo, a idade variou entre 21 e 80 anos, com uma mediana de 54,5 anos. Um total de 53 pacientes (69,7%) foi categorizado como menor ou igual a 60 anos e um total de 23 pacientes (30,3%) foi categorizado como maior de 60 anos. Do total, a maioria era da raça branca (78,9%). (Tabela 1)

Tabela 1 - Frequência das variáveis demográficas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Idade	≤ 60 anos	53	69,7
	> 60 anos	23	30,3
Raça	Branca	60	78,9
	Não Branca	16	21,1

Quanto aos aspectos clínicos, no momento da primeira consulta 47,4% dos pacientes apresentaram algum tipo de doença urológica prévia, 67,1% não tinham sido postectomizados e 23,7% apresentaram infecção pelo vírus HPV. Do total, 64 (84,2%) souberam relatar a ocorrência de antecedentes venéreos, o que acometeu 23 (30,3%) dos 76 pacientes. 53 (69,7%) tiveram menos de 1 ano de evolução da doença antes da primeira consulta. (Tabela 2)

Segundo o Sistema TNM de estadiamento clínico, os pacientes foram categorizados para o estadiamento T em T1+T2 e T3+T4. Assim, 39 (51,3%) apresentaram estadiamento T1+T2 e 37 (48,7%) T3+T4; para o estadiamento N, categorizaram-se em Negativo (N0) e Positivo (N⁺), sendo que 28 (36,8%) apresentaram estadiamento negativo e 48 (63,2%) positivo. 64,5% apresentaram estadiamento clínico III e IV. (Tabela 2)

Tabela 2 - Frequência das variáveis clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcioma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Postectomia	Não	51	67,1
	Sim	8	10,5
	*	17	22,4
HPV	Ausente	57	75,0
	Presente	18	23,7
	*	1	1,3
Antecedentes Venéreos	Sem antecedentes	41	53,9
	Com antecedentes	23	30,3
	*	12	15,8
Doença Prévia	Ausente	40	52,6
	Presente	36	47,4
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	≤ 12 meses	53	69,7
	> 12 meses	20	26,3
	*	3	4,0
Estadiamento T	T1+T2	39	51,3
	T3+T4	37	48,7
Estadiamento N	Negativo (N0)	28	36,8
	Positivo (N ⁺)	48	63,2
Estadio Clínico	I e II	27	35,5
	III e IV	49	64,5

*Sem informação.

4.2 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Nos 76 pacientes avaliados, observou-se o predomínio de tumores bem diferenciados (84,2%) e com tamanho igual ou inferior a cinco centímetros (46,1%).

Com relação à natureza infiltrativa, 47,4% dos tumores apresentaram infiltração de corpo cavernoso, 31,6% apresentaram infiltração de uretra e 50,0% apresentaram infiltração de corpo esponjoso. Na maioria dos casos (97,4%) os tumores apresentaram invasão de órgãos adjacentes, 61,8% apresentaram invasão macroscópica 25,0% apresentaram invasão vascular, 31,6% apresentaram invasão perineural, 51,3% apresentaram invasão de prepúcio e 92,1% apresentaram invasão de glândula.

A recidiva esteve presente em 18 (23,7%) dos 76 pacientes. (Tabela 3)

Tabela 3 - Frequência das variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	10	13,2
	Grau Intermediário e	64	84,2
	Alto Grau *	2	2,6
Tamanho do Tumor	≤ 5 cm	35	46,1
	> 5 cm	20	26,3
	*	21	27,6
Invasão Macroscópica	Ausente	29	38,2
	Presente	47	61,8
Invasão Vascular	Ausente	56	73,7
	Presente	19	25,0
	*	1	1,3
Invasão Perineural	Ausente	51	67,1
	Presente	24	31,6
	*	1	1,3
Infiltração de Corpo Caveroso	Ausente	32	42,1
	Presente	36	47,4
	*	8	10,5
Infiltração de Uretra	Ausente	44	57,9
	Presente	24	31,6
	*	8	10,5
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	28	36,8
	Presente	38	50,0
	*	10	13,2
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	74	97,4
	Presente	1	1,3
	*	1	1,3
Recidiva	Ausente	58	76,3
	Presente	18	23,7
Invasão da Glândula	Ausente	5	6,6
	Lâmina Própria	58	76,3
	Corpus Spongiosum	11	14,5
	Corpora Caverosa	1	1,3
	*	1	1,3
Invasão de Prepúcio	Ausente	34	44,7
	Lâmina Própria	39	51,3
	*	3	4,0

*Sem informação.

4.3 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

4.3.1 Avaliação Imunoistoquímica Do Grupo Controle

Como grupo controle de tecido normal foram avaliados 10 casos de material prepucial proveniente de postectomias por fimose, de pacientes jovens (abaixo de 20 anos), sem nenhuma condição patológica conhecida e sem lesões penianas.

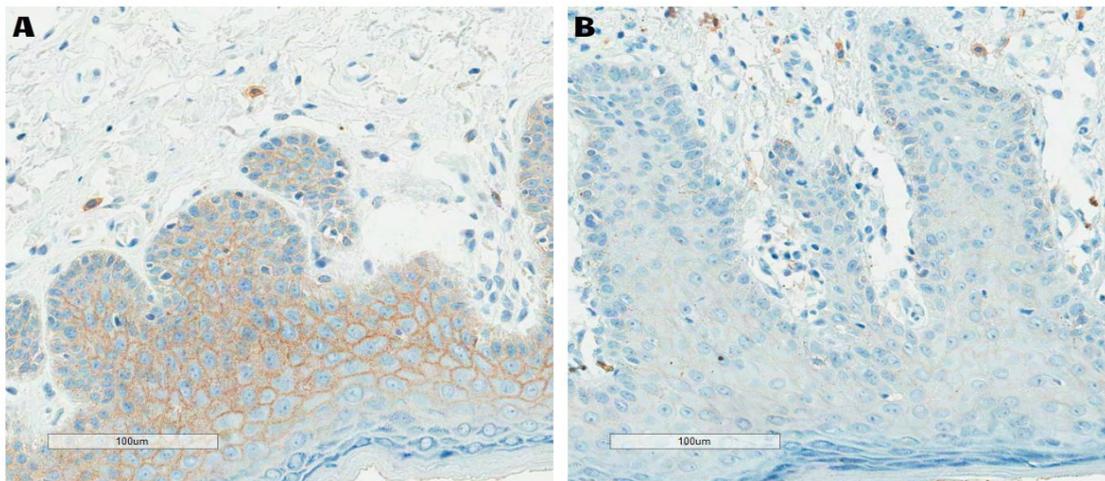
Dessa forma, pôde-se observar que oito casos controle (80,0%) apresentaram a imunorreatividade positiva para CD44(HCAM), nove casos controle (90%) apresentaram a imunorreatividade positiva para CD44V6, 10 casos controle (100%) apresentaram a imunorreatividade positiva para Ezrina e nenhum dos casos controle apresentou a imunorreatividade positiva para Moesina. (Tabela 4)

Tabela 4 - Imunorreatividade das proteínas estudadas de acordo com seus parâmetros obtidos no grupo controle de tecido prepucial normal do A.C. Camargo Cancer Center.

Parâmetro	CD44(HCAM)		CD44V6		Ezrina		Moesina	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativa	2	20	1	10	0	0	10	100
Positiva	8	80	9	90	10	100	0	0
Total	10	100	10	100	10	100	10	100

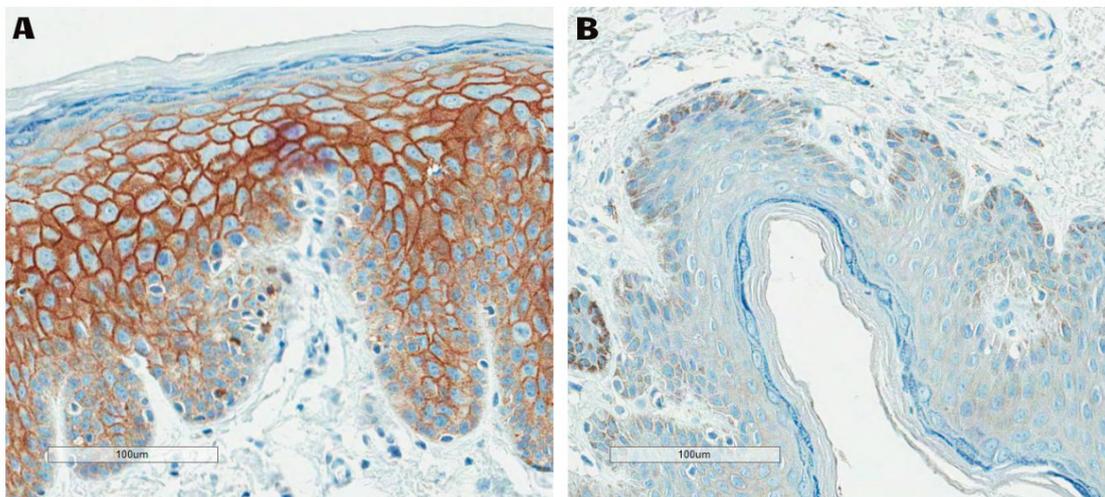
As Figuras 7 a 10 ilustram as imunorreatividades obtidas nos casos controles para cada um dos anticorpos avaliados. Já a Figura 11 caracteriza um caso de carcinoma epidermóide de pênis ilustrando as

imunorreatividades obtidas em suas diferentes regiões, evidenciando a ausência de Moesina na região do epitélio normal.



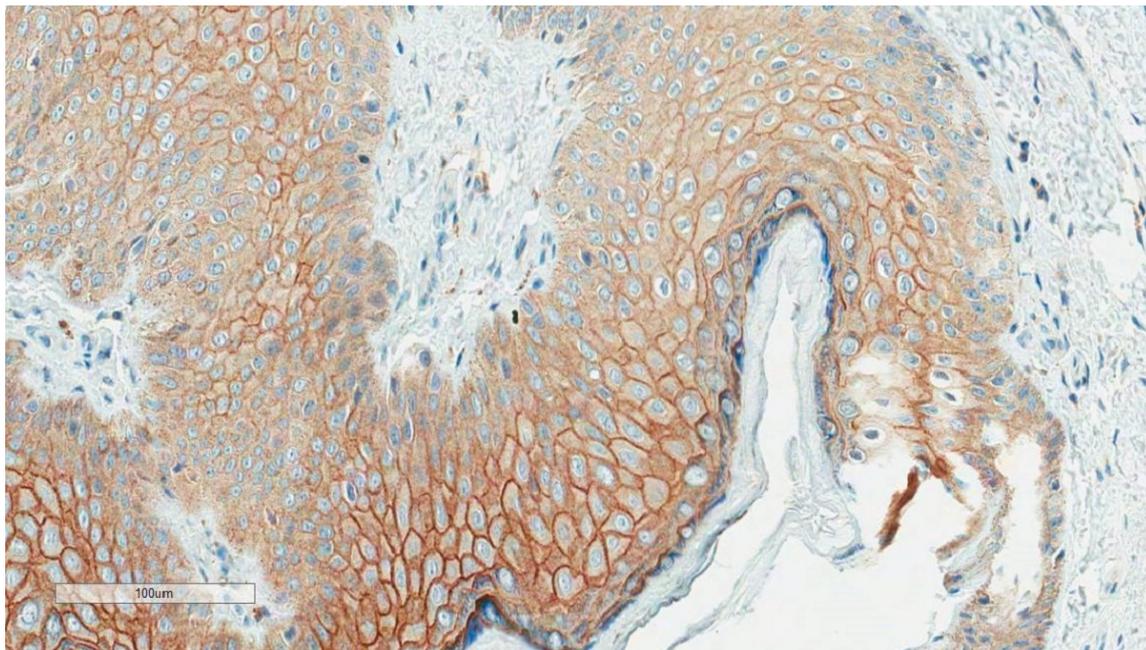
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 7 - Imunorreatividades obtidas para CD44 em corte histológico de tecido prepucial normal. Imunorreatividade positiva (A). Imunorreatividade negativa (B).



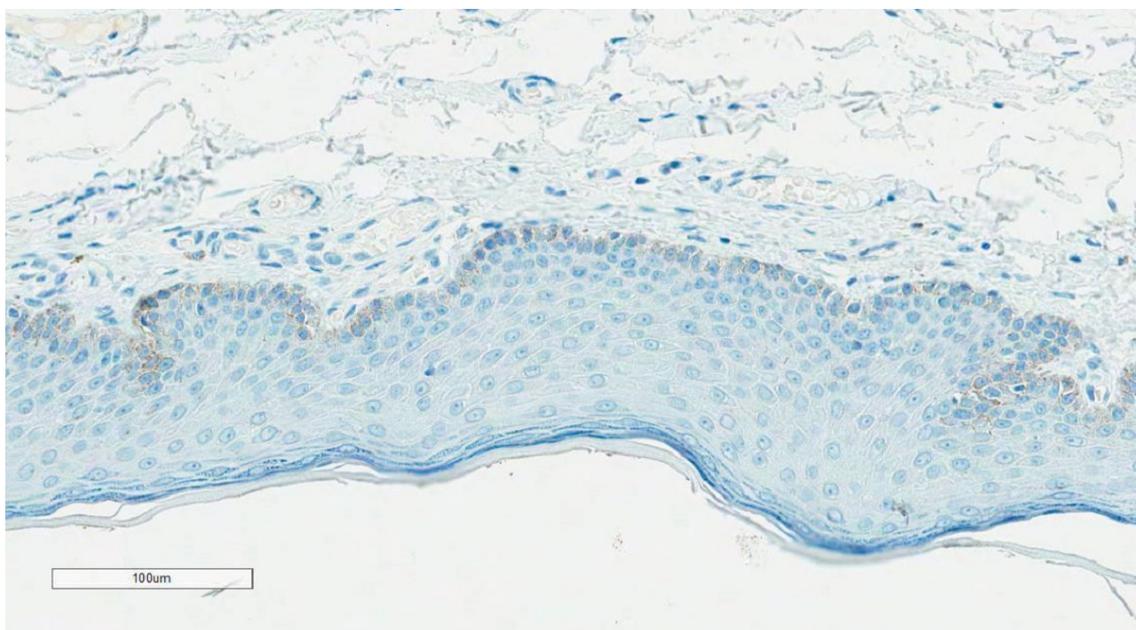
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 8 - Imunorreatividades obtidas para CD44V6 em corte histológico de tecido prepucial normal. Imunorreatividade positiva (A). Imunorreatividade negativa (B).



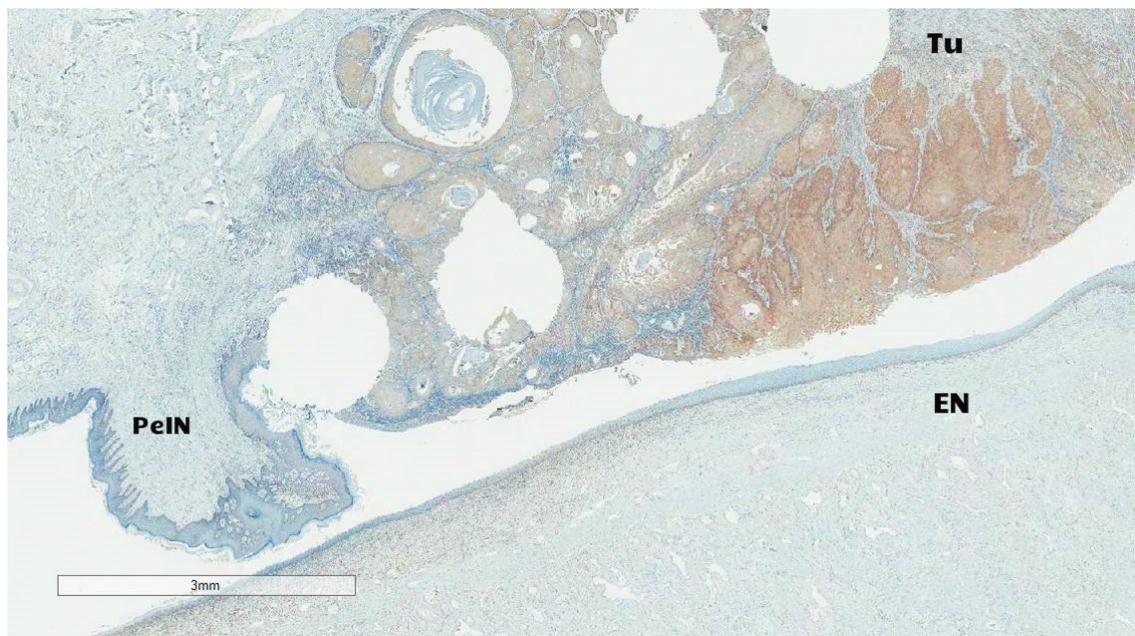
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 9 - Imunorreatividade positiva obtida para Ezrina em corte histológico de tecido prepucial normal.



Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 10 - Imunorreatividade negativa obtida para Moesina em corte histológico de tecido prepucial normal.



Legenda - Coloração H.E. Aumento de 400X. Tu: Tumor; PeIN: Neoplasia Intraepitelial Peniana; EN: Epitélio Normal

Figura 11 - Imagem ilustrando a transição entre o tumor e o PeIN, com imunorreatividade positiva de Moesina em região tumoral e imunorreatividade negativa de Moesina na região do epitélio normal.

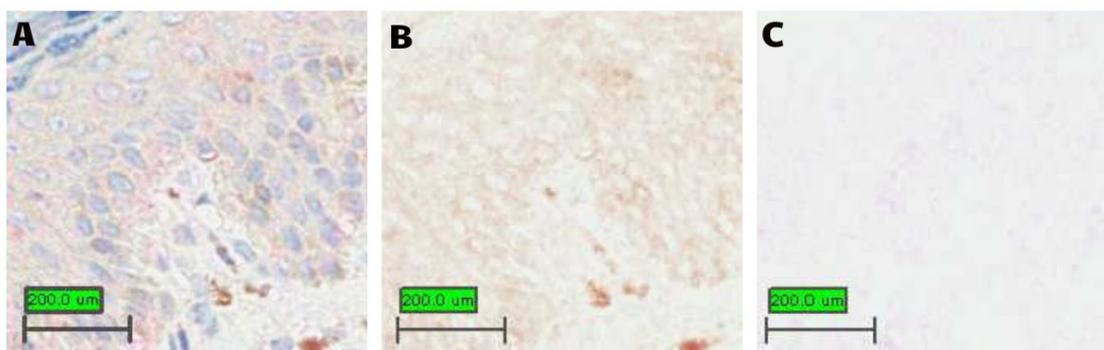
Avaliaram-se também os dados imunoistoquímicos para a co-expressão das proteínas CD44 e CD44V6 com as proteínas da família ERM (Ezrina e Moesina) de acordo com a intensidade de coloração obtida através do software Aperio ImageScope[®]. A partir das imunorreatividades obtidas, estabeleceram-se, então, as relações Ezrina/HCAM, Ezrina/CD44V6, Moesina/HCAM e Moesina/CD44V6.

Com o intuito de se examinar o comportamento de tais relações no tecido normal foram estabelecidas médias das mesmas, cujos valores estão representados na tabela abaixo:

Tabela 5 - Média das relações obtidas das proteínas estudadas no grupo controle de tecido prepucial normal do A.C. Camargo Cancer Center.

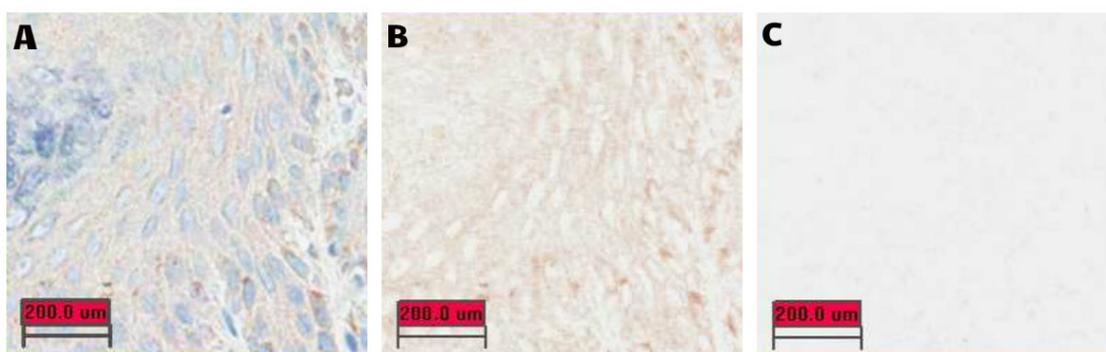
Co-expressão	Média das Imunorreatividades Obtidas		Relação das Médias das Imunorreatividades Obtidas
	Ezrina	CD44(HCAM)	Ezrina/CD44(HCAM)
Ezrina + CD44(HCAM)	66,811	0,204	327,50
	Ezrina	CD44V6	Ezrina/CD44V6
Ezrina + CD44V6	41,044	0,016	2565,25
	Moesina	CD44(HCAM)	Moesina/CD44(HCAM)
Moesina + CD44(HCAM)	39,888	0,064	623,25
	Moesina	CD44V6	Moesina/CD44V6
Moesina + CD44V6	29,985	0,025	1199,40

As imunorreatividades obtidas para os casos controle das co-expressões de Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6 estão exemplificadas pelas Figuras 12 a 15.



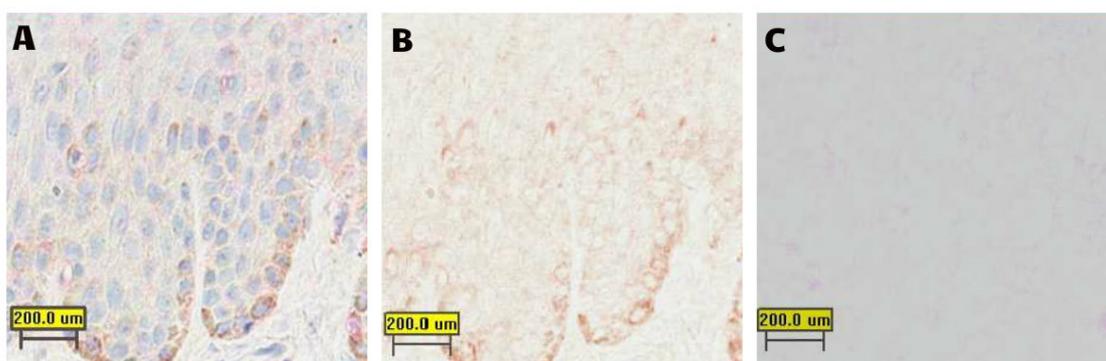
Legenda: Aumento de 400X. Ezrina marcada com DAB; CD44(HCAM) marcada com Permanent Red.

Figura 12 - Imunorreatividade para Ezrina/CD44(HCAM) em corte histológico de tecido prepucial normal. Imunorreatividade para Ezrina + CD44 (HCAM) (A). Imunorreatividade para Ezrina (B). Imunorreatividade para CD44(HCAM) (C).



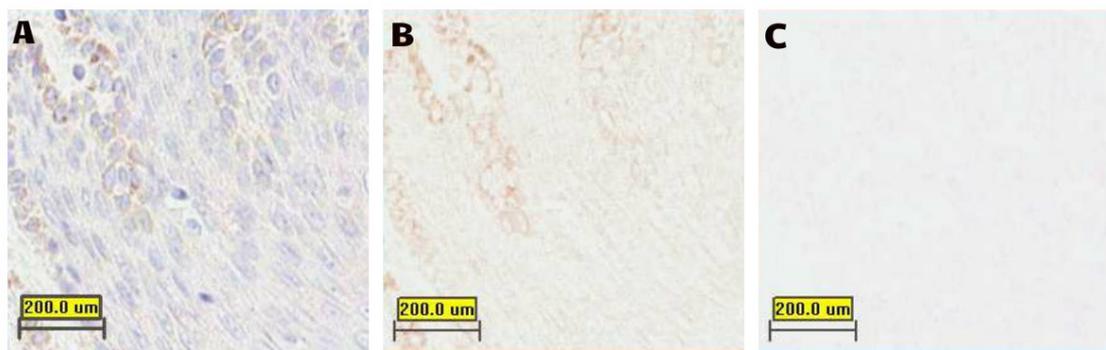
Legenda: Aumento de 400X. Ezrina marcada com DAB; CD44V6 marcada com Permanent Red.

Figura 13 - Imunorreatividade para Ezrina/CD44V6 em corte histológico de tecido prepucial normal. Imunorreatividade para Ezrina + CD44V6 (A). Imunorreatividade para Ezrina (B). Imunorreatividade para CD44V6 (C).



Legenda: Aumento de 400X. Moesina marcada com DAB; CD44(HCAM) marcada com Permanent Red.

Figura 14 - Imunorreatividade para Moesina/CD44(HCAM) em corte histológico de tecido prepucial normal. Imunorreatividade para Moesina + CD44 (HCAM) (A). Imunorreatividade para Moesina (B). Imunorreatividade para CD44(HCAM) (C).



Legenda: Aumento de 400X. Moesina marcada com DAB; CD44V6 marcada com Permanent Red.

Figura 15 - Imunorreatividade para Moesina/CD44V6 em corte histológico de tecido prepucial normal. Imunorreatividade para Moesina + CD44V6 (A). Imunorreatividade para Moesina (B). Imunorreatividade para CD44V6 (C).

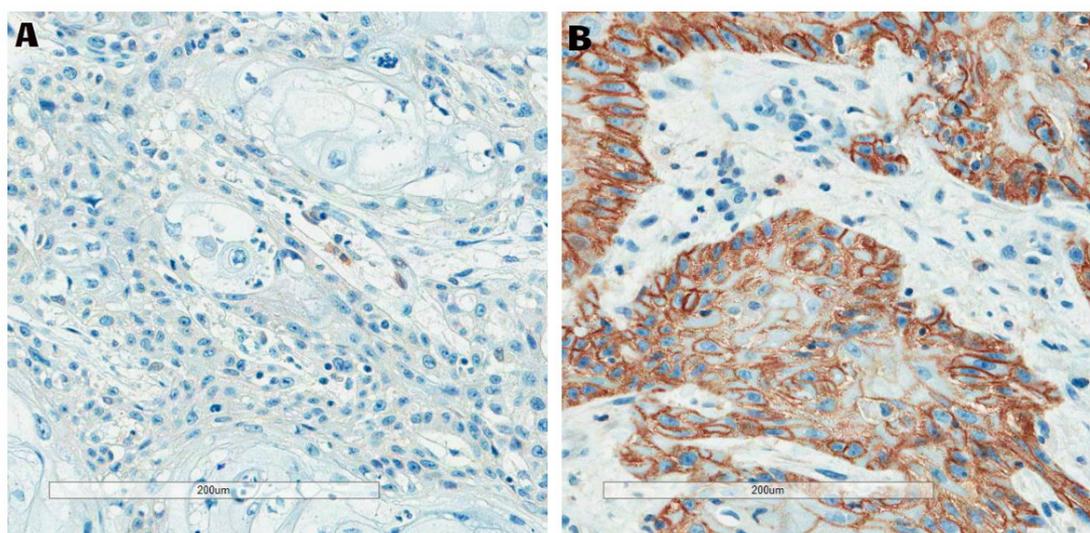
4.3.2 Avaliação Isolada das Proteínas CD44, CD44V6, Ezrina e Moesina

Tanto para CD44(HCAM) e CD44V6, como para Ezrina e Moesina, os parâmetros de imunorreatividade foram categorizados em negativa e positiva, conforme a intensidade obtida para cada reação. Sendo assim, 6,6% dos casos apresentaram expressão positiva para CD44(HCAM), 48,7% apresentaram expressão positiva para CD44V6, 10,5% apresentaram expressão positiva para Ezrina e 43,4% apresentaram expressão positiva para Moesina. (Tabela 6)

Tabela 6 - Imunorreatividade das proteínas estudadas de acordo com seus parâmetros obtidos nos 76 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

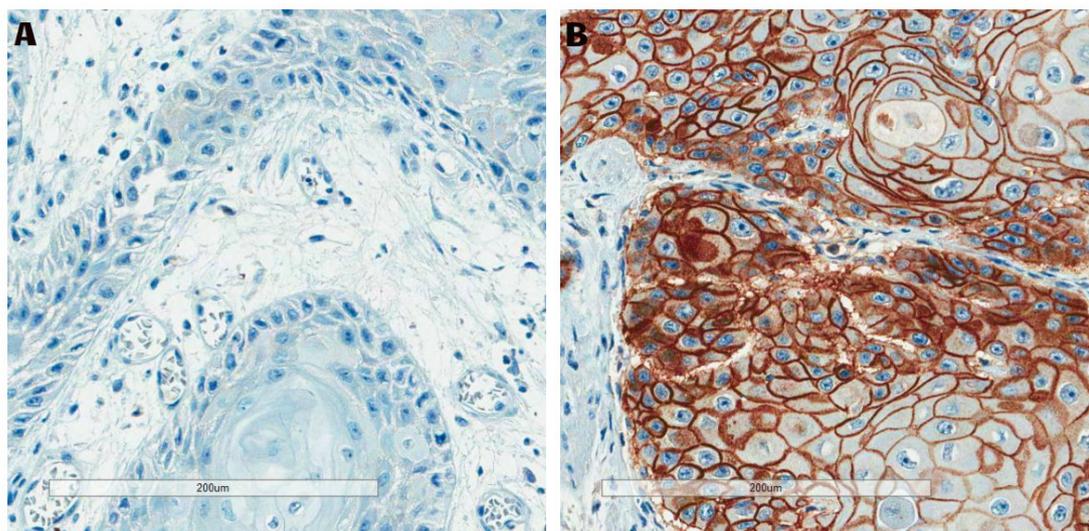
Parâmetro	CD44(HCAM)		CD44V6		Ezrina		Moesina	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativa	71	93,4	39	51,3	68	89,5	43	56,6
Positiva	5	6,6	37	48,7	8	10,5	33	43,4
Total	76	100	76	100	76	100	76	100

As Figuras 16 a 19 ilustram exemplos de imunorreatividades obtidas para CD44(HCAM), CD44V6, Ezrina e Moesina.



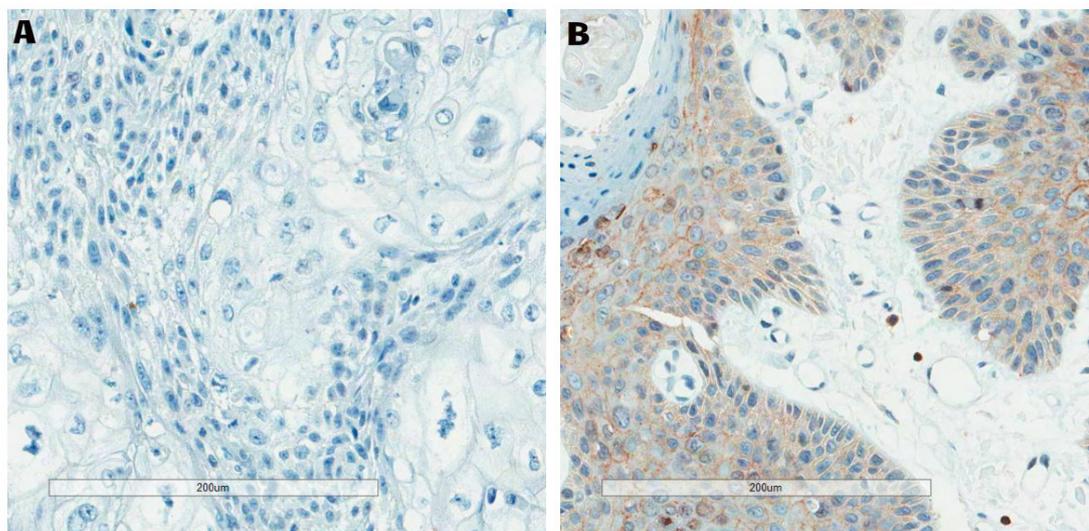
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 16 - Imunorreatividades obtidas para CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade negativa (A). Imunorreatividade positiva (B).



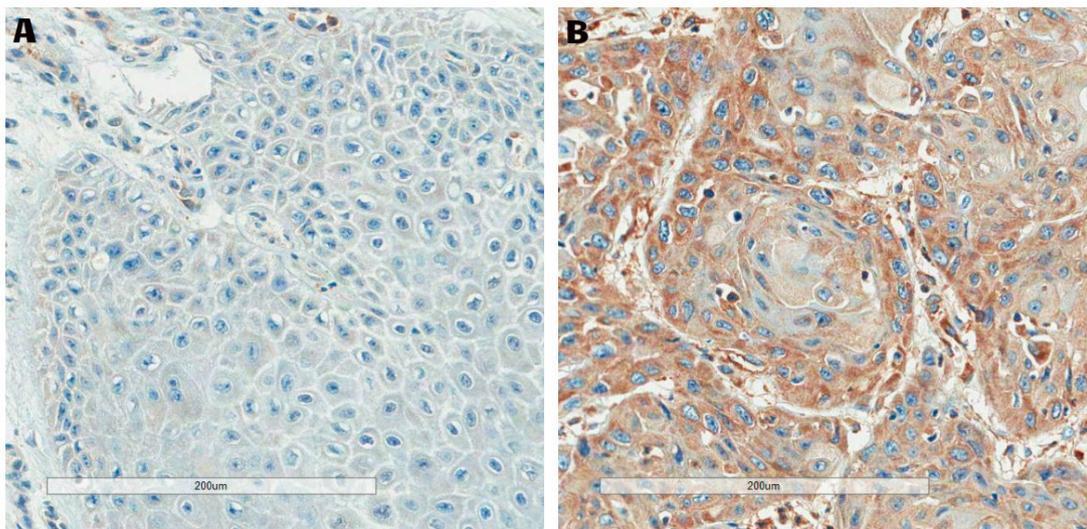
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 17 - Imunorreatividades obtidas para CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunoreatividade negativa (A). Imunoreatividade positiva (B).



Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 18 - Imunorreatividades obtidas para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunoreatividade negativa (A). Imunoreatividade positiva (B).



Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400X.

Figura 19 - Imunorreatividades obtidas para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade negativa (A). Imunorreatividade positiva (B).

As Tabelas 7 e 8 mostram que CD44(HCAM) não se associou significativamente com nenhuma das variáveis clínicas e demográficas avaliadas, e com nenhuma das variáveis anatomopatológicas, respectivamente.

Tabela 7 - Imunorreatividade de CD44(HCAM) de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	CD44(HCAM)		CD44(HCAM) (%)		P (x ²)
		N	P	N	P	
Idade	≤ 60 anos	50	2	96,2	3,8	0,318
	> 60 anos	21	3	87,5	12,5	
Raça	Não Branco	16	0	100,0	0	0,578
	Branco	55	5	91,7	8,3	
Postectomia	Ausente	55	4	93,2	6,8	1,000
	Presente	13	1	92,9	7,1	
HPV	Ausente	53	4	93,0	7,0	0,942
	Presente	17	1	94,4	5,6	
Antecedentes Venéreos	Ausente	38	3	92,7	7,3	1,000
	Presente	21	2	91,3	8,7	
Doença Prévia	Ausente	37	3	92,5	7,5	1,000
	Presente	32	2	94,1	5,9	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	≤ 12 meses	42	4	91,3	8,7	0,645
	> 12 meses	26	1	96,3	3,7	
Estadiamento T	T1 + T2	38	1	97,4	2,6	0,345
	T3 + T4	33	3	91,7	8,3	
Estadiamento N	Negativo (N ⁰)	26	2	92,9	7,1	0,635
	Positivo (N ⁺)	43	2	95,6	4,4	
Estadio Clínico	I e II	24	2	92,3	7,7	0,606
	III e IV	47	2	95,9	4,1	

*Foram excluídos os casos sem informação. Legenda - N – Negativa e P – Positiva.

Tabela 8 - Imunorreatividade de CD44(HCAM) de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	CD44(HCAM)		CD44(HCAM) (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau					1,000
	Grau	10	0	100,0	0	
	Intermediário e Alto Grau	60	4	93,8	6,2	
Tamanho do Tumor	≤ 5 cm	32	3	91,4	8,6	0,352
	> 5 cm	18	2	90,0	10,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	28	1	96,6	3,4	0,644
	Presente	43	4	91,5	8,5	
Invasão Vascular	Ausente	53	3	94,6	5,4	0,596
	Presente	17	2	89,5	10,5	
Invasão Perineural	Ausente	48	3	94,1	5,9	0,653
	Presente	22	2	91,7	8,3	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	28	4	87,5	12,5	0,180
	Presente	35	1	97,2	2,8	
Infiltração de Uretra	Ausente	40	4	90,9	9,1	0,649
	Presente	23	1	95,8	4,2	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	27	1	96,4	3,6	0,631
	Presente	35	3	92,1	7,9	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	69	5	93,2	6,8	0,930
	Presente	1	0	100,0	0	
Recidiva	Ausente	55	3	94,8	5,2	0,587
	Presente	16	2	88,9	11,1	
Invasão da Glândula	Ausente	4	1	80,0	20,0	0,612
	Lâmina Própria	55	3	94,8	5,2	
	Corpus Spongiosum	10	1	90,9	9,1	
	Corpora Cavernosa	1	0	100,0	0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	32	2	94,1	5,9	1,000
	Lâmina Própria	37	2	94,9	5,1	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - N – Negativa e P – Positiva.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas avaliadas, a imunorreatividade para CD44V6 não se mostrou associada a nenhuma delas. (Tabela 9)

Tabela 9 - Imunorreatividade de CD44V6 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	CD44V6		CD44V6 (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Idade	≤ 60 anos	26	26	50,0	50,0	0,736
	> 60 anos	13	11	54,2	45,8	
Raça	Não Branco	9	7	56,2	43,8	0,657
	Branco	30	30	50,0	50,0	
Postectomia	Ausente	31	28	52,5	47,5	0,515
	Presente	6	8	42,9	57,1	
HPV	Ausente	26	31	45,6	54,4	0,184
	Presente	12	6	66,7	33,3	
Antecedentes Venéreos	Ausente	20	21	48,8	51,2	0,552
	Presente	13	10	56,5	43,5	
Doença Prévia	Ausente	22	18	55,0	45,0	0,351
	Presente	15	19	44,1	55,9	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	≤ 12 meses	21	25	45,7	54,3	0,262
	> 12 meses	16	11	59,3	40,7	
Estadiamento T	T1 + T2	23	16	59,0	41,0	0,208
	T3 + T4	16	20	44,4	55,6	
Estadiamento N	Negativo (N0)	14	14	50,0	50,0	0,926
	Positivo (N ⁺)	23	22	51,1	48,9	
Estadio Clínico	I e II	13	13	50,0	50,0	0,801
	III e IV	26	23	53,1	46,9	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - N – Negativa e P – Positiva.

Já em relação às variáveis anatomopatológicas, a perda de expressão de CD44V6 associou-se significativamente com a recidiva ($p=0,042$). (Tabela 10)

Tabela 10 - Imunorreatividade de CD44V6 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	CD44V6		CD44V6 (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	7	3	70,0	30,0	0,310
	Grau Intermediário e Alto Grau	31	33	48,4	51,6	
Tamanho do Tumor	≤ 5 cm	17	18	48,6	51,4	0,113
	> 5 cm	14	6	70,0	30,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	14	15	48,3	51,7	0,677
	Presente	25	22	53,2	46,8	
Invasão Vascular	Ausente	29	27	51,8	48,2	0,739
	Presente	9	10	47,4	52,6	
Invasão Perineural	Ausente	26	25	51,0	49,0	0,937
	Presente	12	12	50,0	50,0	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	16	16	50,0	50,0	0,647
	Presente	20	16	55,6	44,4	
Infiltração de Uretra	Ausente	24	20	54,5	45,5	0,976
	Presente	13	11	54,2	45,8	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	14	14	50,0	50,0	0,833
	Presente	20	18	52,6	47,4	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	37	37	50,0	50,0	0,377
	Presente	1	0	100,0	0	
Recidiva	Ausente	26	32	44,8	55,2	0,042
	Presente	13	5	72,2	27,8	
Invasão da Glândula	Ausente	2	3	40,0	60,0	0,516
	Lâmina Própria	31	27	53,4	46,6	
	Corpus Spongiosum	4	7	36,4	63,6	
	Corpora Cavernosa	1	0	100,0	0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	16	18	47,1	52,9	0,719
	Lâmina Própria	20	19	51,3	48,7	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - N – Negativa e P – Positiva.

Para Ezrina não houve nenhuma associação significativa com as variáveis clínicas e demográficas. (Tabela 11)

Tabela 11 - Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Ezrina		Ezrina (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Idade	≤ 60 anos	45	6	88,2	11,8	1,000
	> 60 anos	22	2	91,7	8,3	
Raça	Não Branco	14	2	87,5	12,5	0,676
	Branco	53	6	89,9	10,2	
Postectomia	Ausente	53	5	91,4	8,6	0,180
	Presente	11	3	78,6	21,4	
HPV	Ausente	50	7	87,7	12,3	0,710
	Presente	16	1	94,1	5,9	
Antecedentes Venéreos	Ausente	38	3	92,7	7,3	0,226
	Presente	18	4	81,8	18,2	
Doença Prévia	Ausente	36	4	90,0	10,0	1,000
	Presente	29	4	87,9	12,1	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	≤ 12 meses	40	6	87,0	13,0	0,702
	> 12 meses	24	2	92,3	7,7	
Estadiamento T	T1 + T2	32	6	84,2	15,8	0,263
	T3 + T4	34	2	94,4	5,6	
Estadiamento N	Negativo (N0)	23	4	85,2	14,8	0,413
	Positivo (N ⁺)	42	3	93,3	6,7	
Estadio Clínico	I e II	21	4	84,0	16,0	0,431
	III e IV	45	4	91,8	8,2	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - N – Negativa e P – Positiva.

Com relação às variáveis anatomopatológicas, a perda de expressão de Ezrina mostrou uma proximidade de associação significativa com a infiltração de corpo cavernoso (p=0,088). (Tabela 12)

Tabela 12 - Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Ezrina		Ezrina (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau					1,000
	Grau	9	1	90,0	10,0	
	Intermediário e Alto Grau	57	7	89,1	10,9	
Tamanho do Tumor	≤ 5 cm	30	5	85,7	14,3	0,559
	> 5 cm	19	1	95,0	5,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	23	5	82,1	17,9	0,141
	Presente	44	3	93,6	6,4	
Invasão Vascular	Ausente	50	5	90,9	9,1	0,415
	Presente	16	3	84,2	15,8	
Invasão Perineural	Ausente	44	6	88,0	12,0	1,000
	Presente	22	2	91,7	8,3	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	26	5	83,9	16,1	0,088
	Presente	35	1	97,2	2,8	
Infiltração de Uretra	Ausente	38	5	88,4	11,6	1,000
	Presente	22	2	91,7	8,3	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	26	1	96,3	3,7	0,224
	Presente	32	6	84,2	15,8	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	65	8	89,0	11,0	0,885
	Presente	1	0	100,0	0	
Recidiva	Ausente	52	6	89,7	10,3	1,000
	Presente	15	2	88,2	11,8	
Invasão da Glândula	Ausente	5	0	100,0	0	0,444
	Lâmina Própria	49	8	86,0	14,0	
	Corpus Spongiosum	11	0	100,0	0	
	Corpora Cavernosa	1	0	100,0	0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	29	4	87,9	12,1	1,000
	Lâmina Própria	35	4	89,7	10,3	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - N – Negativa e P – Positiva.

Para a imunorreatividade de Moesina, não houve nenhuma associação significativa, tanto para as variáveis clínicas e demográficas, como para as variáveis anatomopatológicas. (Tabelas 13 e 14)

Tabela 13 - Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Moesina		Moesina (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Idade	≤ 60 anos	27	25	51,9	48,1	0,228
	> 60 anos	16	8	66,7	33,3	
Raça	Não Branco	7	9	43,8	56,2	0,244
	Branco	36	24	60,0	40,0	
Postectomia	Ausente	35	24	59,3	40,7	0,526
	Presente	7	7	50,0	50,0	
HPV	Ausente	33	24	57,9	42,1	0,509
	Presente	10	8	55,6	44,4	
Antecedentes Venéreos	Ausente	26	15	63,4	36,6	0,840
	Presente	14	9	60,9	39,1	
Doença Prévia	Ausente	22	18	55,0	45,0	0,557
	Presente	21	13	61,8	38,2	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	≤ 12 meses	27	19	58,7	41,3	0,793
	> 12 meses	15	12	55,6	44,4	
Estadiamento T	T1 + T2	19	20	48,7	51,3	0,186
	T3 + T4	23	13	63,9	36,1	
Estadiamento N	Negativo (N0)	16	12	57,1	42,9	0,957
	Positivo (N ⁺)	26	19	57,8	42,2	
Estadio Clínico	I e II	15	11	57,7	42,3	0,830
	III e IV	27	22	55,1	44,9	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - N – Negativa e P – Positiva.

Tabela 14 - Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Moesina		Moesina (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau					0,496
	Grau	7	3	70,0	30,0	
	Intermediário e Alto Grau	34	30	53,1	46,9	
Tamanho do Tumor	≤ 5 cm	17	18	48,6	51,4	0,244
	> 5 cm	11	9	55,0	45,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	13	16	44,8	55,2	0,104
	Presente	30	17	63,8	36,2	
Invasão Vascular	Ausente	30	26	53,6	46,4	0,258
	Presente	13	6	68,4	31,6	
Invasão Perineural	Ausente	27	24	52,9	47,1	0,262
	Presente	16	8	66,7	33,3	
Infiltração de Corpo Caveroso	Ausente	19	13	59,4	40,6	0,751
	Presente	20	16	55,6	44,4	
Infiltração de Uretra	Ausente	26	18	59,1	40,9	0,695
	Presente	13	11	54,2	45,8	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	17	11	60,7	39,3	0,658
	Presente	21	17	55,3	44,7	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	41	33	55,4	44,6	0,455
	Presente	1	0	100,0	0	
Recidiva	Ausente	34	24	58,6	41,4	0,519
	Presente	9	9	50,0	50,0	
Invasão da Glândula	Ausente	3	2	60,0	40,0	0,673
	Lâmina Própria	33	25	56,9	43,1	
	Corpus Spongiosum	7	4	63,6	36,4	
	Corpora Caverosa	0	1	0	100,0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	17	17	50,0	50,0	0,322
	Lâmina Própria	24	15	61,5	38,5	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - N – Negativa e P – Positiva.

4.3.2.1 Análise de Sobrevida

a) Sobrevida Câncer Específica

A taxa de Sobrevida Câncer Específica da população estudada foi determinada para cada um dos marcadores estudados.

Sendo assim, para os casos em que a proteína CD44(HCAM) apresentou imunorreatividade negativa, obteve-se uma taxa de sobrevida câncer específica de 83,9% em cinco anos (60 meses) e de 78,7% em 10 anos (120 meses). Para os casos em que a imunorreatividade de CD44(HCAM) apresentou-se positiva, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 80,0% tanto em cinco anos (60 meses), como em 10 anos (120 meses).

Dentre os casos com imunorreatividade negativa para CD44V6, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 80,4% em cinco anos (60 meses) e de 74,2% em 10 anos (120 meses). Para os casos com imunorreatividade positiva para CD44V6, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 85,9% em cinco anos (60 meses) e de 82,7% em 10 anos (120 meses).

Considerando-se os casos que apresentaram imunorreatividade negativa para Ezrina, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 82,8% em cinco anos (60 meses) e de 80,6% em 10 anos (120 meses). Para os casos com imunorreatividade positiva para Ezrina, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 87,5% em cinco anos (60 meses) e de 58,3% em 10 anos (120 meses).

Com relação aos casos que apresentaram imunorreatividade negativa para Moesina, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 86,5% em cinco

anos (60 meses) e de 81,1% em 10 anos (120 anos). Para os casos que apresentaram imunorreatividade positiva para Moesina, a taxa de sobrevivida câncer específica foi de 79,8% em cinco anos (60 meses) e de 75,8% em 10 anos (120 meses).

As curvas de sobrevivida câncer específica obtidas para os quatro marcadores avaliados estão ilustradas na figura abaixo:

SOBREVIDA CÂNCER ESPECÍFICA

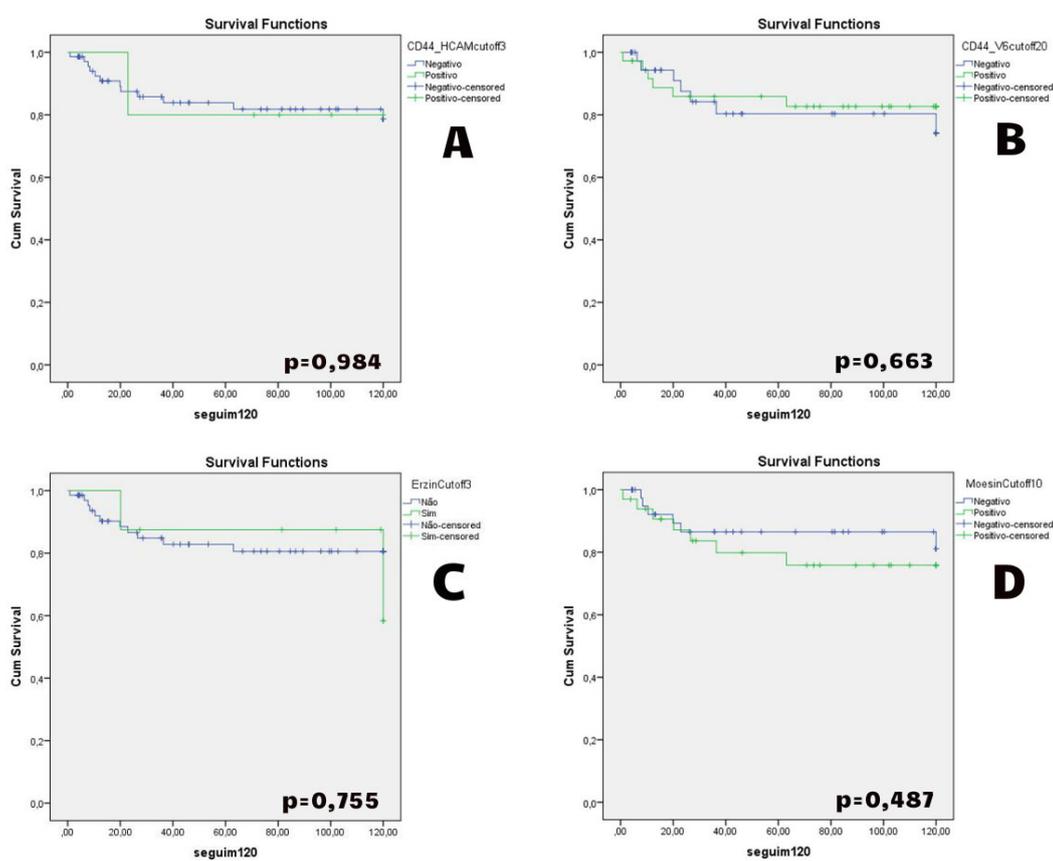


Figura 20 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica para os 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center. CD44(HCAM) (A), CD44V6 (B), Ezrina (C) e Moesina (D).

Não houve influência significativa da sobrevida câncer específica com nenhuma das variáveis imunoistoquímicas estudadas. (Tabela 15)

Tabela 15 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Sobrevida	Sobrevida	P (log rank)
		Câncer Específica em 5 anos (%)	Câncer Específica em 10 anos (%)	
CD44(HCAM)	N	83,9	78,7	0,984
	P	80,0	80,0	
CD44V6	N	80,4	74,2	0,663
	P	85,9	82,7	
Ezrina	N	82,8	80,6	0,755
	P	87,5	58,3	
Moesina	N	86,5	81,1	0,487
	P	79,8	75,8	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** – N – negativa; P – positiva.

b) **Sobrevida Livre de Doença**

Dentro da população estudada, foi estabelecida a taxa de sobrevida livre de doença para cada um dos marcadores avaliados.

Dessa forma, para os casos que apresentaram imunorreatividade negativa para CD44(HCAM) a taxa de sobrevida livre de doença foi de 82,1% em cinco anos (60 meses) e de 68,4% em 10 anos (120 meses). Para os casos que apresentaram imunorreatividade positiva para CD44(HCAM), a taxa de sobrevida livre de doença foi de 80,0% em cinco anos (60 meses) e de 53,3% em 10 anos (120 meses).

Considerando-se os casos que apresentaram imunorreatividade negativa para CD44V6, a taxa de sobrevida livre de doença para os mesmos foi de 69,9% em cinco anos (60 meses) e de 65,8% em 10 anos (120 meses). Para os casos que apresentaram a imunorreatividade positiva para CD44V6, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 93,9% em cinco anos (60 meses) e de 79,0% em 10 anos (120 meses).

Dentre os casos que apresentaram imunorreatividade negativa para Ezrina, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 80,9% em cinco anos (60 meses) e de 70,0% em 10 anos (120 meses). Para os casos em que a imunorreatividade de Ezrina apresentou-se positiva, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 87,5% em cinco anos (60 meses) e de 58,3% em 10 anos (120 anos).

Para os casos em que a imunorreatividade de Moesina se apresentou negativa, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 86,6% em cinco anos (60 meses) e de 68,7% em 10 anos (120 meses). Já para os casos em que a imunorreatividade de Moesina se apresentou positiva, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 76,3% em cinco anos (60 meses) e de 65,2% em 10 anos (120 meses).

A Figura 21 ilustra as curvas de sobrevida livre de doença obtidas para os quatro marcadores avaliados.

SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

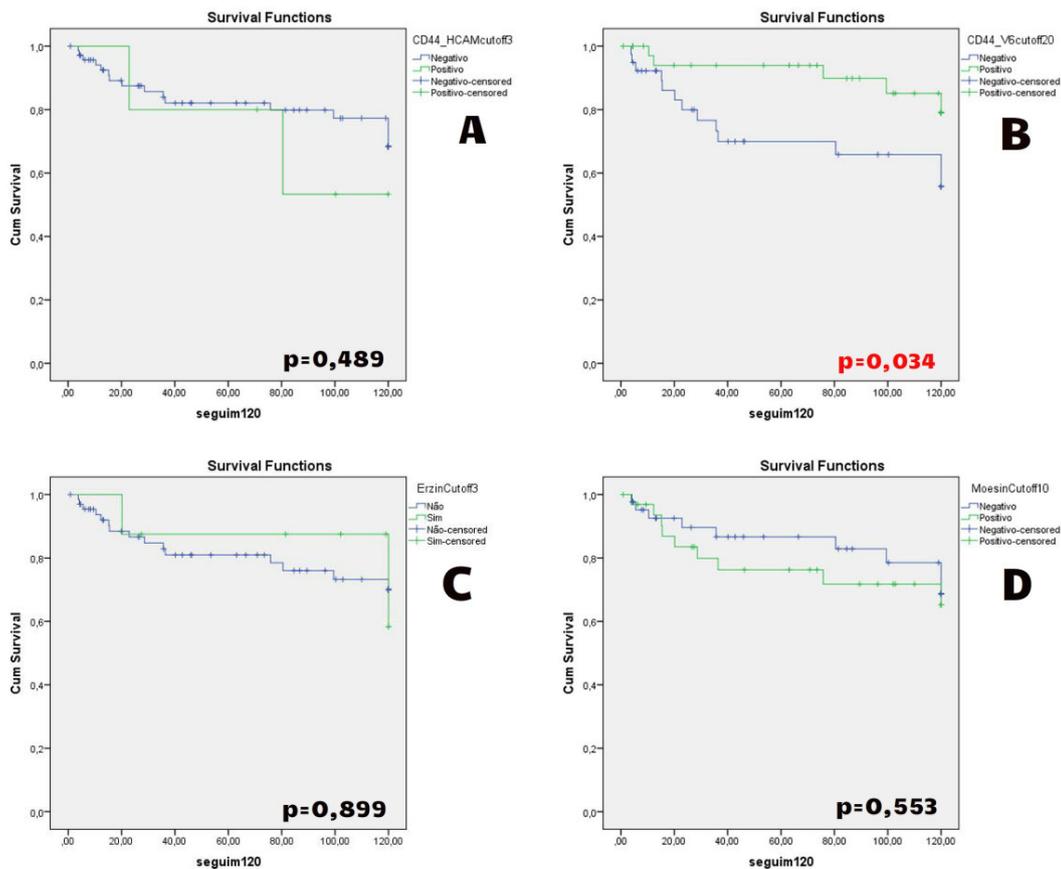


Figura 21 - Curvas de Sobrevida Livre de Doença para os 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center. CD44(HCAM) (A), CD44V6 (B), Ezrina (C) e Moesina (D).

Dentre as variáveis imunoistoquímicas estudadas, apenas CD44V6 influenciou significativamente a sobrevida livre de doença ($p=0,034$). (Tabela 16)

Tabela 16 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Sobrevida	Sobrevida	P (log rank)
		Livre de Doença em 5 anos (%)	Livre de Doença em 10 anos (%)	
CD44(HCAM)	N	82,1	68,4	0,489
	P	80,0	53,3	
CD44V6	N	69,9	65,8	0,034
	P	93,9	79,0	
Ezrina	N	80,9	70,0	0,899
	P	87,5	58,3	
Moesina	N	86,6	68,7	0,553
	P	76,3	65,2	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** – N – negativa; P – positiva.

c) **Sobrevida Global**

A avaliação da taxa de sobrevida global da população estudada foi feita para cada um dos marcadores estudados.

Assim sendo, nos casos em que a imunorreatividade de CD44(HCAM) se apresentou negativa, a taxa de sobrevida global foi de 75,6% em cinco anos e de 32,8% em 10 anos (120 meses). Já para os casos em que a imunorreatividade de CD44(HCAM) se apresentou positiva, a taxa de sobrevida global foi de 80,0% tanto em cinco anos (60 meses), como em 10 anos (120 meses).

No que se diz respeito aos casos de CD44V6 que apresentaram imunorreatividade negativa, a taxa de sobrevida global foi de 70,2% em cinco anos (60 meses) e de 40,3% em 10 anos (120 meses). Para os casos

de CD44V6 que apresentaram imunorreatividade positiva, a taxa de sobrevida global foi de 80,1% em cinco anos (60 meses) e de 29,9% em 10 anos (120 meses).

Com relação aos casos que apresentaram imunorreatividade negativa para Ezrina, a taxa de sobrevida global foi de 74,0% em cinco anos (60 meses) e de 37,9% em 10 anos (120 meses). Nos casos em que a imunorreatividade para Ezrina se apresentou positiva, a taxa de sobrevida global foi de 87,5% em cinco anos (60 meses) e de 17,5% em 10 anos (120 meses).

Levando-se em conta os casos que apresentaram imunorreatividade negativa para Moesina, a taxa de sobrevida global foi de 72,8% em cinco anos (60 meses) e de 36,6% em 10 anos (120 meses). Já para os casos em que a imunorreatividade de Moesina apresentou-se positiva, a taxa de sobrevida global foi de 79,8% em cinco anos (60 meses) e de 31,5% em 10 anos (120 meses).

A figura abaixo ilustra as curvas de sobrevida global obtidas para os quatro marcadores avaliados:

SOBREVIDA GLOBAL

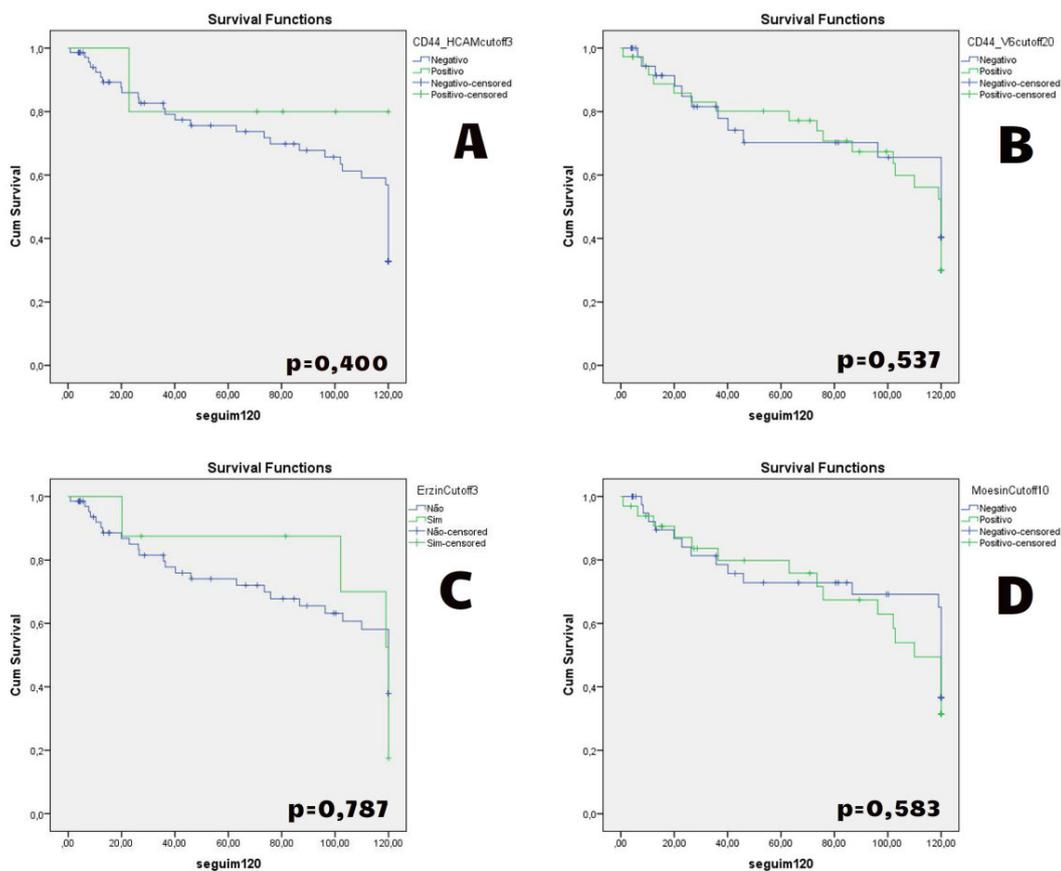


Figura 22 - Curvas de Sobrevida Global para os 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center. CD44(HCAM) (A), CD44V6 (B), Ezrina (C) e Moesina (D).

Não houve influência significativa da sobrevida global com nenhuma das variáveis imunoistoquímicas estudadas. (Tabela 17)

Tabela 17 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as variáveis imunistoquímicas dos 76 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Sobrevida	Sobrevida	P (log rank)
		Global em 5 anos (%)	Global em 10 anos (%)	
CD44(HCAM)	N	75,6	32,8	0,400
	P	80,0	80,0	
CD44V6	N	70,2	40,3	0,537
	P	80,1	29,9	
Ezrina	N	74,0	37,9	0,787
	P	87,5	17,5	
Moesina	N	72,8	36,6	0,583
	P	79,8	31,5	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** – N – negativa; P – positiva.

4.3.3 Avaliação das Relações das Proteínas Co-Expressas

Os dados imunistoquímicos para a co-expressão das proteínas CD44 e CD44V6 com as proteínas da família ERM (Ezrina e Moesina) foram avaliados quanto à intensidade de coloração obtida através do software Aperio ImageScope[®] e levaram ao estabelecimento das relações Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6.

Para cada uma dessas relações os parâmetros de imunorreatividade foram categorizados em inferior a 100 e superior a 100, conforme os valores obtidos.

Neste ponto, dos 76 pacientes com carcinoma de pênis previamente avaliados, 75 (98,7%) puderam ser avaliados quanto aos dados imunoistoquímicos.

Sendo assim, 42,7% dos casos obtiveram uma relação Ezrina/CD44(HCAM) superior a 100, 40,0% dos casos obtiveram uma relação Ezrina/CD44V6 superior a 100, 33,3% dos casos obtiveram uma relação Moesina/CD44(HCAM) superior a 100 e 38,7% dos casos obtiveram uma relação Moesina/CD44V6 superior a 100. (Tabelas 18 e 19)

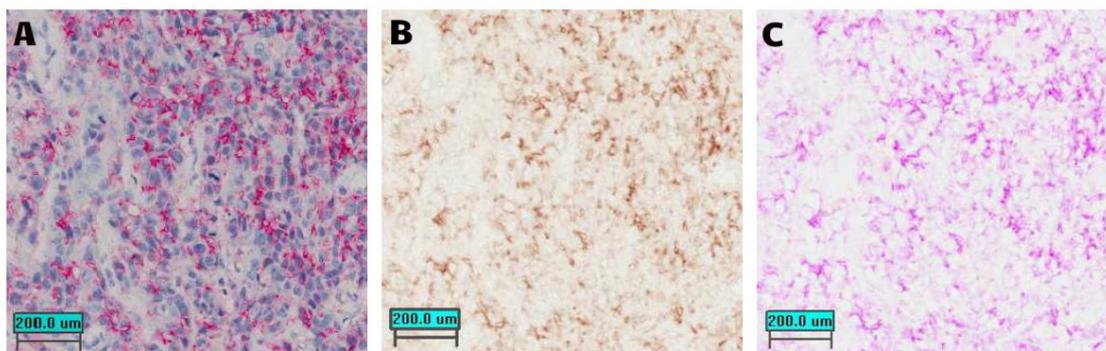
Tabela 18 - Relação de Ezrina com CD44(HCAM) e CD44V6 de acordo com seus parâmetros obtidos nos 75 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Parâmetro	Ezrina/HCAM	Ezrina/HCAM	Ezrina/CD44V6	Ezrina/CD44V6
	(N)	(%)	(N)	(%)
<100	43	57,3	45	60,0
>100	32	42,7	30	40,0
Total	75	100	75	100

Tabela 19 - Relação de Moesina com CD44(HCAM) e CD44V6 de acordo com seus parâmetros obtidos nos 75 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

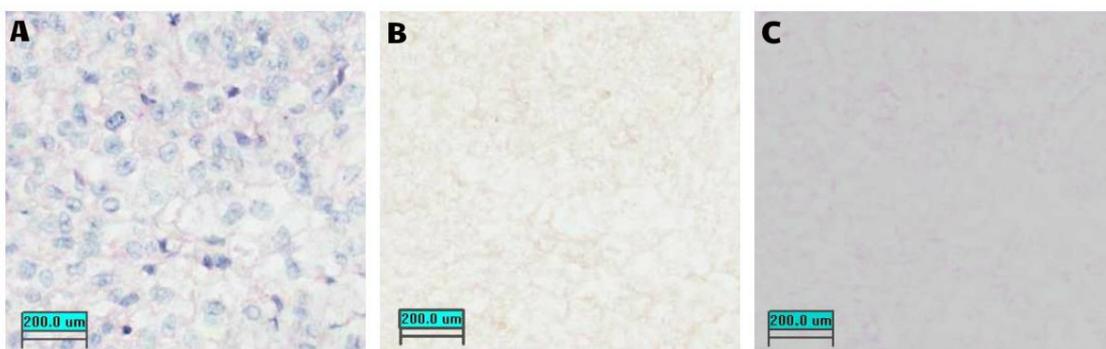
Parâmetro	Moesina/HCAM	Moesina/HCAM	Moesina/CD44V6	Moesina/CD44V6
	(N)	(%)	(N)	(%)
<100	50	66,7	46	61,3
>100	25	33,3	29	38,7
Total	75	100	75	100

As Figuras 23 a 30 ilustram exemplos de imunorreatividades obtidas para Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6.



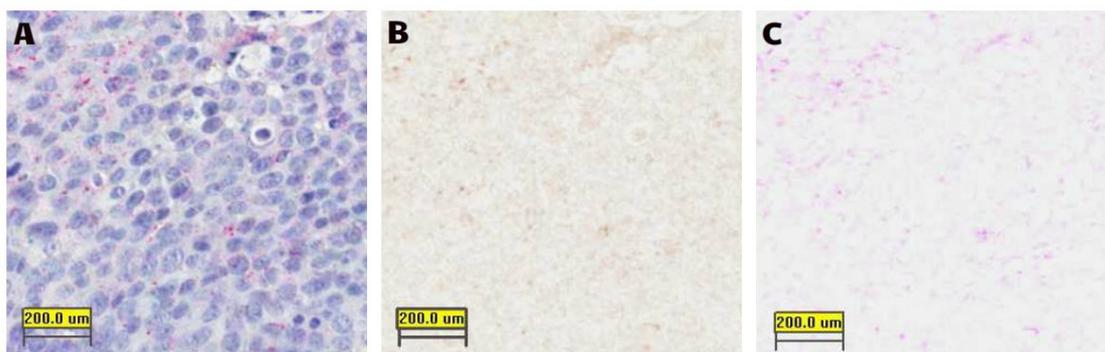
Legenda: Aumento de 400X. Ezrina marcada com DAB; CD44(HCAM) marcada com Permanent Red.

Figura 23 - Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Ezrina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Ezrina + CD44(HCAM) (A). Imunorreatividade para Ezrina (B). Imunorreatividade para CD44(HCAM) (C).



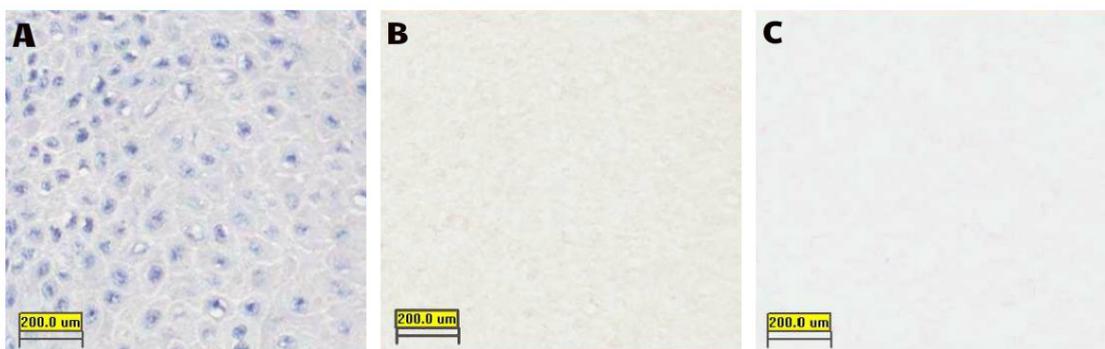
Legenda: Aumento de 400X. Ezrina marcada com DAB; CD44(HCAM) marcada com Permanent Red.

Figura 24 - Imunorreatividade superior a 100 obtida para Ezrina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Ezrina + CD44(HCAM) (A). Imunorreatividade para Ezrina (B). Imunorreatividade para CD44(HCAM) (C).



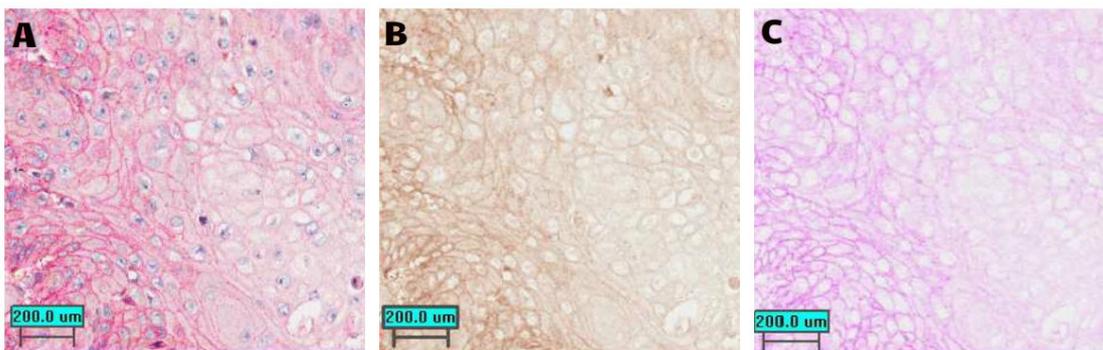
Legenda: Aumento de 400X. Ezrina marcada com DAB; CD44V6 marcada com Permanent Red.

Figura 25 - Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Ezrina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Ezrina + CD44V6 (A). Imunorreatividade para Ezrina (B). Imunorreatividade para CD44V6 (C).



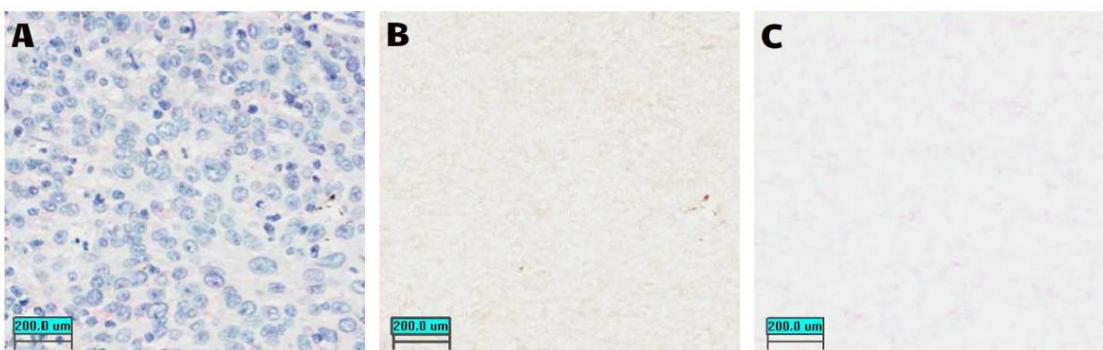
Legenda: Aumento de 400X. Ezrina marcada com DAB; CD44V6 marcada com Permanent Red.

Figura 26 - Imunorreatividade superior a 100 obtida para Ezrina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Ezrina + CD44V6 (A). Imunorreatividade para Ezrina (B). Imunorreatividade para CD44V6 (C).



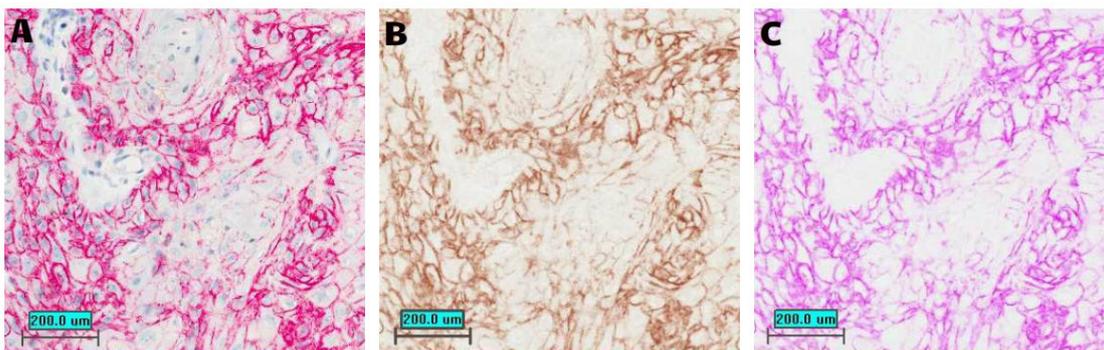
Legenda: Aumento de 400X. Moesina marcada com DAB; CD44(HCAM) marcada com Permanent Red.

Figura 27 - Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Moesina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Moesina + CD44(HCAM) (A). Imunorreatividade para Moesina (B). Imunorreatividade para CD44(HCAM) (C).



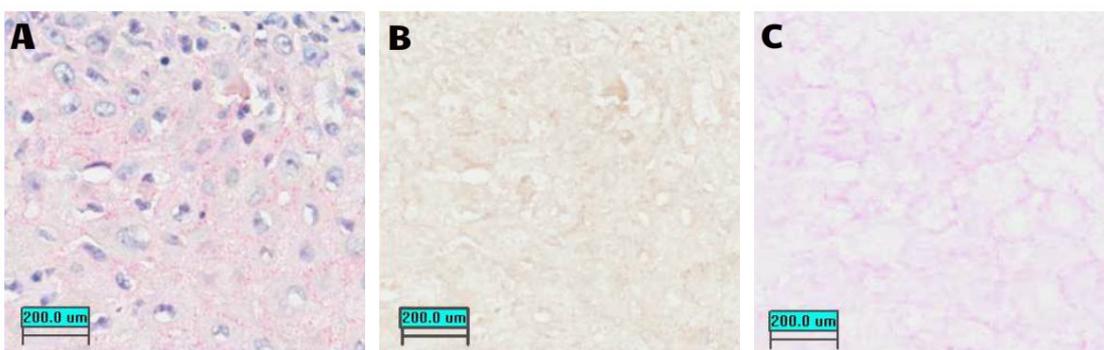
Legenda: Aumento de 400X. Moesina marcada com DAB; CD44(HCAM) marcada com Permanent Red.

Figura 28 - Imunorreatividade superior a 100 obtida para Moesina/CD44(HCAM) em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Moesina + CD44(HCAM) (A). Imunorreatividade para Moesina (B). Imunorreatividade para CD44(HCAM) (C).



Legenda: Aumento de 400X. Moesina marcada com DAB; CD44V6 marcada com Permanent Red.

Figura 29 - Imunorreatividade inferior a 100 obtida para Moesina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Moesina + CD44V6 (A). Imunorreatividade para Moesina (B). Imunorreatividade para CD44V6 (C).



Legenda: Aumento de 400X. Moesina marcada com DAB; CD44V6 marcada com Permanent Red.

Figura 30 - Imunorreatividade superior a 100 obtida para Moesina/CD44V6 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis. Imunorreatividade para Moesina + CD44V6 (A). Imunorreatividade para Moesina (B). Imunorreatividade para CD44V6 (C).

i. Análise Univariada

A Tabela 20 mostra que a relação Ezrina/CD44(HCAM) não se associou significativamente com nenhuma das variáveis clínicas e demográficas avaliadas.

Tabela 20 - Relação de Ezrina/CD44(HCAM) de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação Ezrina/HCAM (N)		Relação Ezrina/HCAM (%)		P (χ^2)
		<100	>100	<100	>100	
Idade	< 60 anos	29	22	56,9	43,1	0,904
	> 60 anos	14	10	58,3	41,7	
Raça	Não Branco	9	7	56,2	43,8	0,921
	Branco	34	25	57,6	42,4	
Postectomia	Ausente	31	27	53,4	46,6	0,464
	Presente	9	5	64,3	35,7	
HPV	Ausente	31	26	54,4	45,6	0,516
	Presente	11	6	64,7	35,3	
Antecedentes Venéreos	Ausente	25	16	61,0	39,0	0,237
	Presente	10	12	45,5	54,5	
Doença Prévia	Ausente	23	17	57,5	42,5	0,800
	Presente	18	15	54,5	45,5	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	< 12 meses	26	20	56,5	43,5	0,923
	> 12 meses	15	11	57,7	42,3	
Estadiamento T	T1 + T2	21	17	55,3	44,7	0,790
	T3 + T4	21	15	58,3	41,7	
Estadiamento N	Negativo (N0)	16	11	59,3	40,7	0,759
	Positivo (N ⁺)	25	20	55,6	44,4	
Estadio Clínico	I e II	15	10	60,0	40,0	0,687
	III e IV	27	22	55,1	44,9	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Já com relação às variáveis anatomopatológicas, o aumento da relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se significativamente associada ao tamanho do tumor ($p=0,015$) e à infiltração de corpo cavernoso ($p=0,049$), enquanto que a diminuição da relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se significativamente associada à recidiva ($p=0,018$). (Tabela 21)

Tabela 21 - Relação de Ezrina/HCAM de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação Ezrina/HCAM (N)		Relação Ezrina/HCAM (%)		P (χ^2)
		<100	>100	<100	>100	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	7	3	70,0	30	0,499
	Grau Intermediário e Alto	35	29	54,7	45,3	
Tamanho do Tumor	< 5 cm	24	11	68,6	31,4	0,015
	> 5 cm	13	7	65,0	35,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	18	10	64,3	35,7	0,347
	Presente	25	22	53,2	46,8	
Invasão Vascular	Ausente	32	23	58,2	41,8	0,674
	Presente	10	9	52,6	47,4	
Invasão Perineural	Ausente	29	21	58,0	42,0	0,755
	Presente	13	11	54,2	45,8	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	22	9	71,0	29,0	0,049
	Presente	17	19	47,2	52,8	
Infiltração de Uretra	Ausente	28	15	65,1	34,9	0,226
	Presente	15	12	50,0	50,0	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	16	11	59,3	40,7	0,912
	Presente	22	16	57,9	42,1	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	42	31	57,5	42,5	0,352
	Presente	0	1	0	100,0	
Recidiva	Ausente	29	29	50,0	50,0	0,018
	Presente	14	3	82,4	17,6	
Invasão da Glândula	Ausente	2	3	40,0	60,0	0,552
	Lâmina Própria	34	23	59,6	40,4	
	Corpus Spongiosum	5	6	45,5	54,5	
	Corpora Cavernosa	1	0	100,0	0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	17	16	51,5	48,5	0,392
	Lâmina Própria	24	15	61,5	38,5	

*Foram excluídos os casos sem informação.

No que se refere à relação Ezrina/CD44V6, não houve associação significativa com nenhuma das variáveis clínicas e demográficas avaliadas, embora o seu aumento tenha demonstrado uma proximidade em se associar com o estadiamento N ($p=0,054$). (Tabela 22)

Tabela 22 - Relação de Ezrina/CD44V6 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação		Relação		P (χ^2)
		Ezrina/CD44V6 (N)		Ezrina/CD44V6 (%)		
		<100	>100	<100	>100	
Idade	< 60 anos	33	18	64,7	35,3	0,225
	> 60 anos	12	12	50,0	50,0	
Raça	Não Branco	11	5	68,8	31,2	0,421
	Branco	34	25	57,6	42,4	
Postectomia	Ausente	33	25	56,9	43,1	0,615
	Presente	9	5	64,3	35,7	
HPV	Ausente	34	23	59,6	40,4	0,712
	Presente	10	7	58,8	41,2	
Antecedentes Venéreos	Ausente	27	14	65,9	34,1	0,378
	Presente	12	10	12,0	10,0	
Doença Prévia	Ausente	22	18	55,0	45,0	0,455
	Presente	21	12	63,6	36,4	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	≤ 12 meses	27	19	58,7	41,3	0,934
	> 12 meses	15	11	57,7	42,3	
Estadiamento T	T1 + T2	22	16	57,9	42,1	0,778
	T3 + T4	22	14	61,1	38,9	
Estadiamento N	Negativo (N0)	20	7	74,1	25,9	0,054
	Positivo (N ⁺)	23	22	51,1	48,9	
Estadio Clínico	I e II	18	7	72,0	28,0	0,117
	III e IV	26	23	53,1	46,9	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Dentre as variáveis anatomopatológicas, apenas a recidiva ($p=0,032$) mostrou-se significativamente associada à diminuição da relação Ezrina/CD44V6, muito embora o tamanho do tumor ($p=0,098$) também tenha demonstrado uma proximidade de associação à diminuição da relação Ezrina/CD44V6. (Tabela 23)

Tabela 23 - Relação de Ezrina/CD44V6 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação Ezrina/CD44V6 (N)		Relação Ezrina/CD44V6 (%)		P (χ^2)
		<100	>100	<100	>100	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	6	4	60,0	40,0	1,000
	Grau Intermediário e	38	26	59,4	40,6	
	Alto Grau					
Tamanho do Tumor	< 5 cm	19	16	54,3	45,7	0,098
	> 5 cm	16	4	80,0	20,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	20	8	71,4	28,6	0,119
	Presente	25	22	53,2	46,8	
Invasão Vascular	Ausente	33	22	60,0	40,0	0,872
	Presente	11	8	57,9	42,1	
Invasão Perineural	Ausente	31	19	62,0	38,0	0,521
	Presente	13	11	54,2	45,8	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	21	10	67,7	32,3	0,307
	Presente	20	16	55,6	44,4	
Infiltração de Uretra	Ausente	28	15	65,1	34,9	0,378
	Presente	13	11	54,2	45,8	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	19	8	70,4	29,6	0,304
	Presente	22	16	57,9	42,1	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	44	29	60,3	39,7	0,338
	Presente	0	1	0	100,0	
Recidiva	Ausente	31	27	53,4	46,6	0,032
	Presente	14	3	82,4	17,6	
Invasão da Glândula	Ausente	3	2	60,0	40,0	0,329
	Lâmina Própria	36	21	63,2	36,8	
	Corpus Spongiosum	4	7	36,4	63,6	
	Corpora Cavernosa	1	0	100,0	0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	18	15	54,5	45,5	0,410
	Lâmina Própria	25	14	64,1	35,9	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Para a relação Moesina/CD44(HCAM) não houve nenhuma associação significativa com as variáveis clínicas e demográficas, embora o tempo de evolução da doença antes da primeira consulta ($p=0,056$) tenha demonstrado uma proximidade de associação à sua diminuição. (Tabela 24)

Tabela 24 - Relação de Moesina/CD44(HCAM) de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação Moesina/HCAM (N)		Relação Moesina/HCAM (%)		P (χ^2)
		<100	>100	<100	>100	
Idade	< 60 anos	36	15	70,6	29,4	0,294
	> 60 anos	14	10	58,3	41,7	
Raça	Não Branco	9	7	56,2	43,8	0,319
	Branco	41	18	69,5	30,5	
Postectomia	Ausente	37	21	63,8	36,2	0,359
	Presente	11	3	78,6	21,4	
HPV	Ausente	36	21	63,2	36,8	0,460
	Presente	13	4	76,5	23,5	
Antecedentes Venéreos	Ausente	30	11	73,2	26,8	0,135
	Presente	12	10	54,5	45,5	
Doença Prévia	Ausente	26	14	65,0	35,0	0,881
	Presente	22	11	66,7	33,3	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	< 12 meses	27	19	58,7	41,3	0,056
	> 12 meses	21	5	80,8	19,2	
Estadiamento T	T1 + T2	25	13	65,8	34,2	0,936
	T3 + T4	24	12	66,7	33,3	
Estadiamento N	Negativo (N0)	20	7	74,1	25,9	0,225
	Positivo (N ⁺)	27	18	60,0	40,0	
Estadio Clínico	I e II	18	7	72,0	28,0	0,452
	III e IV	31	18	63,3	36,7	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Quanto às variáveis anatomopatológicas, a diminuição da relação Moesina/CD44(HCAM) mostrou-se significativamente associada com a recidiva ($p=0,006$). (Tabela 25)

Tabela 25 - Relação de Moesina/CD44(HCAM) de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação Moesina/HCAM (N)		Relação Moesina/HCAM (%)		P (χ^2)
		<100	>100	<100	>100	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	8	2	80,0	20,0	0,479
	Grau Intermediário e Alto Grau	41	23	64,1	35,9	
Tamanho do Tumor	< 5 cm	24	11	68,6	31,4	0,385
	> 5 cm	15	5	75,0	25,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	18	10	64,3	35,7	0,736
	Presente	32	15	68,1	31,9	
Invasão Vascular	Ausente	39	16	70,9	29,1	0,146
	Presente	10	9	52,6	47,4	
Invasão Perineural	Ausente	34	16	68,0	32,0	0,640
	Presente	15	9	62,5	37,5	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	21	10	67,7	32,3	0,881
	Presente	25	11	69,4	30,6	
Infiltração de Uretra	Ausente	30	13	69,8	30,2	0,544
	Presente	15	9	62,5	37,5	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	20	7	74,1	25,9	0,179
	Presente	22	16	57,9	42,1	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	48	25	65,8	34,2	0,598
	Presente	1	0	100,0	0	
Recidiva	Ausente	34	24	58,6	41,4	0,006
	Presente	16	1	94,1	5,9	
Invasão da Glândula	Ausente	3	2	60,0	40,0	0,121
	Lâmina Própria	41	16	71,9	28,1	
	Corpus Spongiosum	4	7	36,4	63,6	
	Corpora Cavernosa	1	0	100,0	0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	20	13	60,6	39,4	0,444
	Lâmina Própria	27	12	69,2	30,8	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Para a relação Moesina/CD44V6 não houve nenhuma associação significativa com as variáveis clínicas e demográficas avaliadas. (Tabela 26)

Tabela 26 - Relação de Moesina/CD44V6 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação		Relação		P (χ^2)
		Moesina/CD44V6 N)		Moesina/CD44V6 (%)		
		<100	>100	<100	>100	
Idade	< 60 anos	33	18	64,7	35,3	0,382
	> 60 anos	13	11	54,2	45,8	
Raça	Não Branco	8	8	50,0	50,0	0,294
	Branco	38	21	64,4	35,6	
Postectomia	Ausente	34	24	58,6	41,4	0,698
	Presente	9	5	64,3	35,7	
HPV	Ausente	35	22	61,4	38,6	0,713
	Presente	10	7	58,8	41,2	
Antecedentes Venéreos	Ausente	26	15	63,4	36,6	0,736
	Presente	13	9	59,1	40,9	
Doença Prévia	Ausente	25	15	62,5	37,5	0,669
	Presente	19	14	57,6	42,4	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	< 12 meses	29	17	63,0	37,0	0,655
	> 12 meses	15	11	57,7	42,3	
Estadiamento T	T1 + T2	24	14	63,2	36,8	0,671
	T3 + T4	21	15	58,3	41,7	
Estadiamento N	Negativo (N0)	18	9	66,7	33,3	0,454
	Positivo (N ⁺)	26	19	57,8	42,2	
Estadio Clínico	I e II	16	9	64	36,0	0,688
	III e IV	29	20	59,2	40,8	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Das variáveis anatomopatológicas, tanto o tamanho do tumor ($p=0,038$), como a invasão de prepúcio ($p=0,043$) mostraram-se significativamente associadas à diminuição da relação Moesina/CD44V6. (Tabela 2)

Tabela 27 - Relação de Moesina/CD44V6 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Variável	Categoria	Relação Moesina/CD44V6 (N)		Relação Moesina/CD44V6 (%)		P (χ^2)
		<100	>100	<100	>100	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	5	5	50,0	50,0	0,500
	Intermediário e Alto Grau	40	24	62,5	37,5	
Tamanho do Tumor	< 5 cm	19	16	54,3	45,7	0,038
	> 5 cm	17	3	85,0	15,0	
Invasão Macroscópica	Ausente	18	10	64,3	35,7	0,685
	Presente	28	19	59,6	40,4	
Invasão Vascular	Ausente	36	19	65,5	34,5	0,164
	Presente	9	10	47,4	52,6	
Invasão Perineural	Ausente	33	17	66,0	34,0	0,187
	Presente	12	12	50,0	50,0	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	22	9	71,0	29,0	0,282
	Presente	21	15	58,3	41,7	
Infiltração de Uretra	Ausente	30	13	69,8	30,2	0,345
	Presente	14	10	58,3	41,7	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	19	8	70,4	29,6	0,304
	Presente	22	16	57,9	42,1	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	45	28	61,6	38,4	0,330
	Presente	0	1	0	100,0	
Recidiva	Ausente	34	24	58,6	41,4	0,373
	Presente	12	5	70,6	29,4	
Invasão da Glândula	Ausente	2	3	40,0	60,0	0,601
	Lâmina Própria	36	21	63,2	36,8	
	Corpus Spongiosum	6	5	54,5	45,5	
	Corpora Cavernosa	1	0	100,0	0	
Invasão do Prepúcio	Ausente	16	17	48,5	51,5	0,043
	Lâmina Própria	28	11	71,8	28,2	

*Foram excluídos os casos sem informação.

ii. Análise Multivariada

A lista com as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para as relações Ezrina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6 estão apresentadas nas Tabelas 28 e 29, em ordem de entrada, para avaliação multivariada.

Tabela 28 - Fatores utilizados para a análise multivariada, para risco de recidiva na relação Ezrina/CD44(HCAM).

Variável	P
Tamanho do Tumor	0,149
Infiltração de Corpo Caveroso	0,001

No modelo multivariado foram levadas em consideração as duas variáveis listadas para risco de recidiva na relação Ezrina/CD44(HCAM). Dessa forma, a infiltração de corpo cavernoso (RR = 5,593; IC 95% [1,616–19,361]) foi o fator independente de risco para a recidiva.

Tabela 29 - Fatores utilizados para a análise multivariada, para risco de recidiva na relação Moesina/CD44V6.

Variável	P
Tamanho do Tumor	0,184
Invasão do Prepúcio	0,380

No modelo multivariado foram levadas em consideração as duas variáveis listadas para risco de recidiva na relação Moesina/CD44V6,

entretanto, nenhuma delas foi considerada como fator independente de risco para a recidiva.

4.3.3.1 Análise de Sobrevida

a) Sobrevida Câncer Específica

A taxa de sobrevida câncer específica foi determinada na população estudada para cada uma das relações obtidas através da co-expressão das proteínas avaliadas.

Dessa maneira, para os casos em que a relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se inferior a 100, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 83,4% em cinco anos (60 meses) e de 77,5% em 10 anos (120 meses). Para os casos em que a relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se superior a 100, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 83,5% em cinco anos (60 meses) e de 79,3% em 10 anos (120 meses).

A respeito dos casos que mostraram a relação Ezrina/CD44V6 inferior a 100, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 81,4% em cinco anos (60 meses) e de 76,4% em 10 anos (120 meses). Para os casos que mostraram a relação Ezrina/CD44V6 superior a 100, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 85,9% em cinco anos (60 meses) e de 82,0% em 10 anos (120 meses).

Para os casos que apresentaram a relação Moesina/CD44(HCAM) inferior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 80,9% em cinco anos (60 meses) e de 76,4% em 10 anos (120 meses). Já para os casos em que a relação Moesina/CD44(HCAM) apresentou-se superior a 100, a taxa

de sobrevida câncer específica foi de 87,5% em cinco anos (60 meses) e de 81,6% em 10 anos (120 meses).

Nos casos em que a relação Moesina/CD44V6 se mostrou inferior a 100, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 84,8% em cinco anos (60 meses) e de 76,9% em 10 anos (120 meses). Para os casos em que a relação Moesina/CD44V6 se mostrou superior a 100, a taxa de sobrevida câncer específica foi de 80,8% tanto em cinco anos (60 meses), como em 10 anos (120 meses).

A Figura 31 ilustra as curvas de sobrevida câncer específica obtidas para cada uma das quatro relações avaliadas.

SOBREVIDA CÂNCER ESPECÍFICA

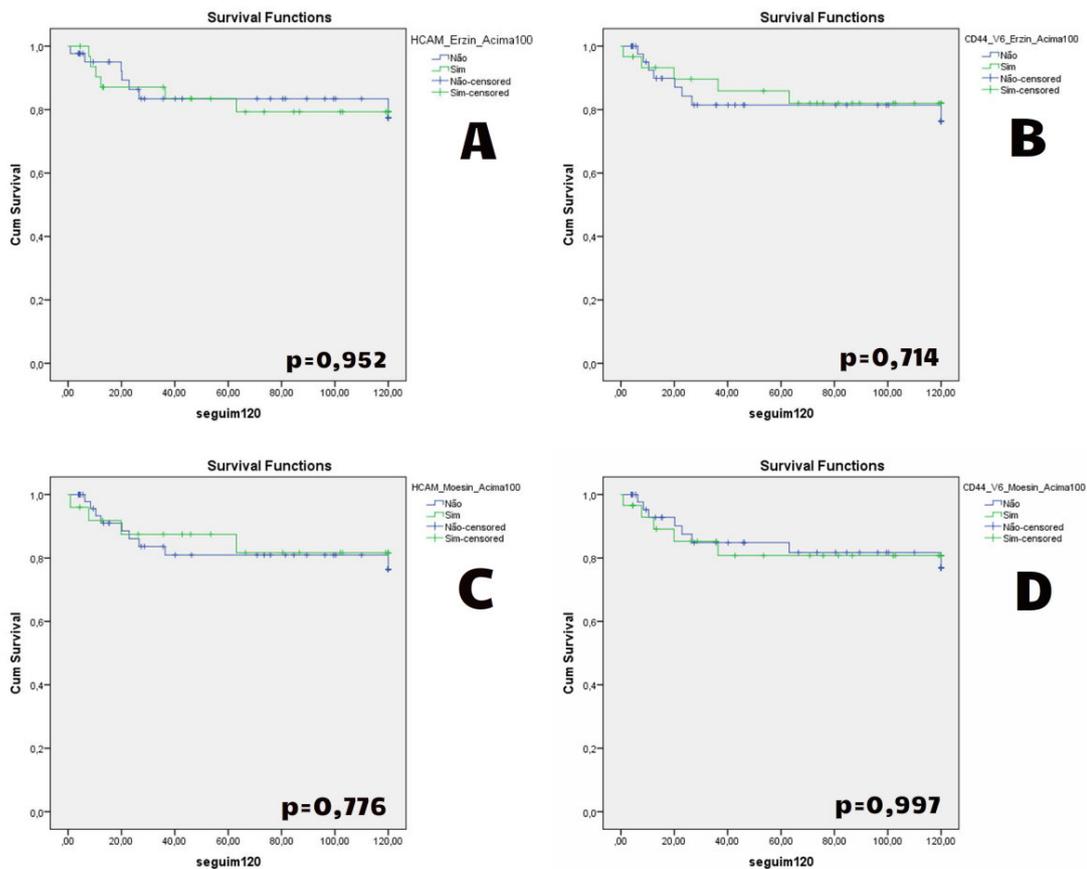


Figura 31 - Curvas de Sobrevida Câncer Específica das relações para os 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center. Ezrina/CD44(HCAM) (A), Ezrina/CD44V6 (B), Moesina/CD44(HCAM) (C) e Moesina/CD44V6 (D).

Não houve influência significativa da sobrevida câncer específica com nenhuma das relações imunohistoquímicas estudadas. (Tabela 30)

Tabela 30 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as relações imunoistoquímicas obtidas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Relação	Categoria	Sobrevida	Sobrevida	P (log rank)
		Câncer Específica em 5 anos (%)	Câncer Específica em 10 anos (%)	
Ezrina/CD44(HCAM)	<100	83,4	77,5	0,952
	>100	83,5	79,3	
Ezrina/CD44V6	<100	81,4	76,4	0,714
	>100	85,9	82,0	
Moesina/CD44(HCAM)	<100	80,9	76,4	0,776
	>100	87,5	81,6	
Moesina/CD44V6	<100	84,8	76,9	0,997
	>100	80,8	80,8	

*Foram excluídos os casos sem informação.

b) Sobrevida Livre de Doença

A taxa de sobrevida livre de doença foi determinada na população estudada para cada uma das relações obtidas através da co-expressão das proteínas avaliadas.

Assim sendo, para os casos em que a relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se inferior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 75,9% em cinco anos (60 meses) e de 55,7% em 10 anos (120 meses). Nos casos em que a relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se superior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 89,2% tanto em cinco anos (60 meses), como em 10 anos (120 meses).

Para os casos em que a relação Ezrina/CD44V6 apresentou-se inferior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 72,3% em cinco anos (60 meses) e de 60,9% em 10 anos (120 meses). Nos casos em que a

relação Ezrina/CD44V6 apresentou-se superior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 95,8% em cinco anos (60 meses) e de 81,5% em 10 anos (120 meses).

Nos casos em que a relação Moesina/CD44(HCAM) mostrou-se inferior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 73,0% em cinco anos (60 meses) e de 59,4% em 10 anos (120 meses). Já para os casos em que a relação Moesina/CD44(HCAM) mostrou-se superior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 100% em cinco anos (60 meses) e de 92,3% em 10 anos (120 meses).

Considerando-se os casos em que a relação Moesina/CD44V6 se apresentou inferior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 86,6% em cinco anos (60 meses) e de 67,3% em 10 anos (120 meses). Nos casos em que a relação Moesina/CD44V6 se apresentou superior a 100, a taxa de sobrevida livre de doença foi de 86,6% em cinco anos (60 meses) e de 71,9% em 10 anos (120 meses).

As curvas de sobrevida livre de doença obtidas para as quatro relações avaliadas estão ilustradas na figura 32.

SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

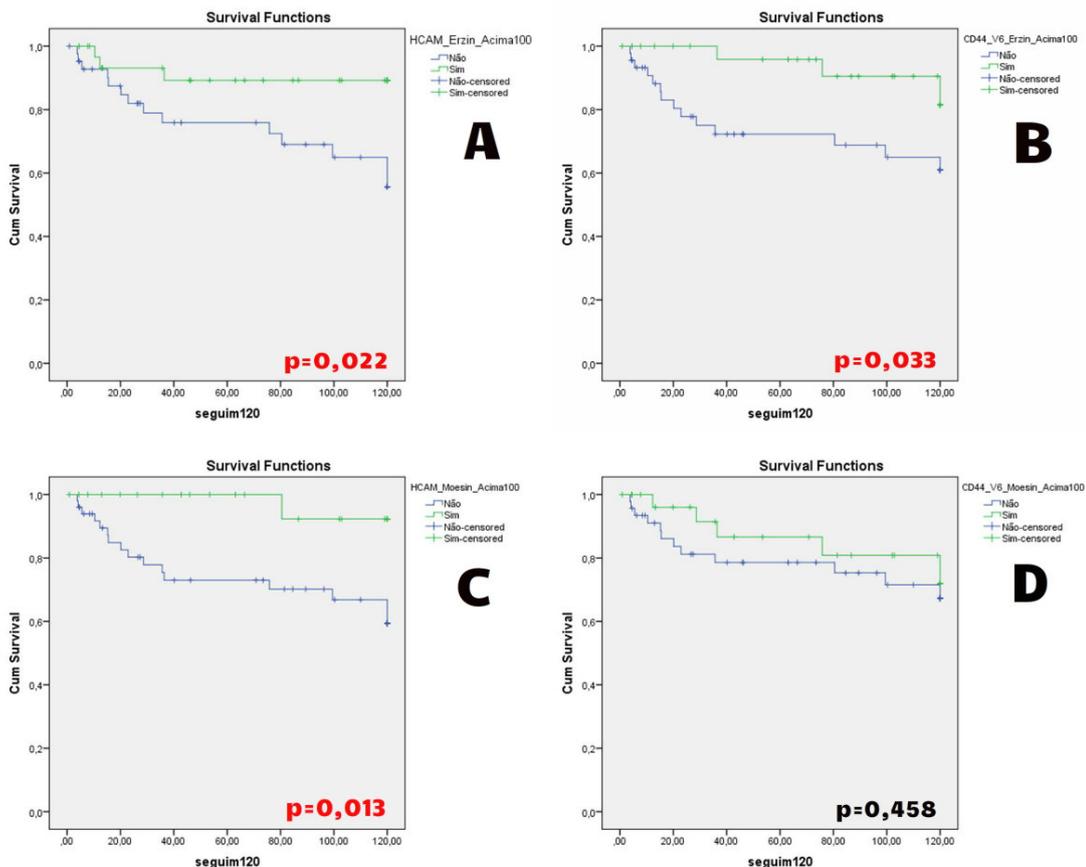


Figura 32 - Curvas de Sobrevida Livre de Doença das relações para os 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center. Ezrina/CD44(HCAM) (A), Ezrina/CD44V6 (B), Moesina/CD44(HCAM) (C) e Moesina/CD44V6 (D).

A Tabela 31 mostra que as relações Ezrina/CD44(HCAM) ($p=0,013$), Ezrina/CD44V6 ($p=0,033$) e Moesina/CD44(HCAM) ($p=0,013$) influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença.

Tabela 31 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as relações imunoistoquímicas obtidas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Relação	Categoria	Sobrevida Livre de Doença em 5 anos (%)	Sobrevida Livre de Doença em 10 anos (%)	P (log rank)
Ezrina/CD44(HCAM)	<100	75,9	55,7	0,022
	>100	89,2	89,2	
Ezrina/CD44V6	<100	72,3	60,9	0,033
	>100	95,8	81,5	
Moesina/CD44(HCAM)	<100	73,0	59,4	0,013
	>100	100,0	92,3	
Moesina/CD44V6	<100	78,6	67,3	0,458
	>100	86,6	71,9	

*Foram excluídos os casos sem informação.

c) Sobrevida Global

A taxa de sobrevida global foi determinada na população estudada para cada uma das relações obtidas através da co-expressão das proteínas avaliadas.

Portanto, para os casos em que a relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se inferior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 77,4% em cinco anos (60 meses) e de 41,9% em 10 anos (120 meses). Para os casos em que a relação Ezrina/CD44(HCAM) mostrou-se superior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 73,8% em cinco anos (60 meses) e de 29,0% em 10 anos (120 meses).

Para os casos em que a relação Ezrina/CD44V6 se mostrou inferior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 71,9% em cinco anos (60 meses) e de

46,8% em 10 anos (120 meses). Nos casos em que a relação Ezzina/CD44V6 se mostrou superior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 79,4% em cinco anos (60 meses) e de 22,7% em 10 anos (120 meses).

Com referência aos casos em que a relação Moesina/CD44(HCAM) se apresentou inferior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 78,2% em cinco anos (60 meses) e de 36,4% em 10 anos (120 meses). Para os casos em que a relação Moesina/CD44(HCAM) se apresentou superior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 70,7% em cinco anos (60 meses) e de 33,0% em 10 anos (120 meses).

No que diz respeito aos casos que mostraram a relação Moesina/CD44V6 inferior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 77,1% em cinco anos (60 meses) e de 45,3% em 10 anos (120 meses). Já para os casos que mostraram a relação Moesina/CD44V6 superior a 100, a taxa de sobrevida global foi de 73,2% em cinco anos (60 meses) e de 21,0% em 10 anos (120 anos).

A Figura 33 ilustra as curvas de sobrevida global obtidas para as quatro relações avaliadas.

SOBREVIDA GLOBAL

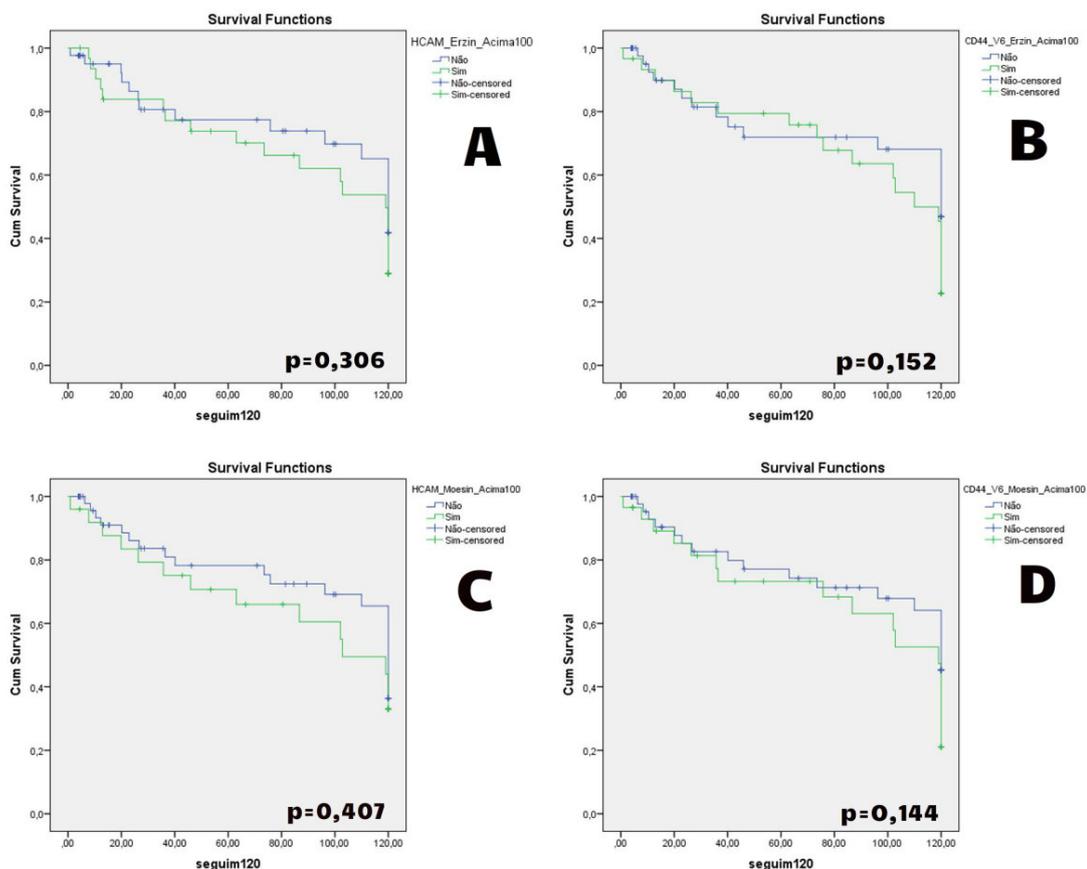


Figura 33 - Curvas de Sobrevida Global das relações para os 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center. Ezrina/CD44(HCAM) (A), Ezrina/CD44V6 (B), Moesina/CD44(HCAM) (C) e Moesina/CD44V6 (D).

Não houve influência significativa da sobrevida global com nenhuma das relações imunohistoquímicas estudadas. (Tabela 32)

Tabela 32 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em cinco anos e em 10 anos, de acordo com as relações imunistoquímicas obtidas dos 75 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do A.C. Camargo Cancer Center.

Relação	Categoria	Sobrevida	Sobrevida	P (log rank)
		Global em 5 anos (%)	Global em 10 anos (%)	
Ezrina/CD44(HCAM)	<100	77,4	41,9	0,306
	>100	73,8	29,0	
Ezrina/CD44V6	<100	71,9	46,8	0,152
	>100	79,4	22,7	
Moesina/CD44(HCAM)	<100	78,2	36,4	0,407
	>100	70,7	33,0	
Moesina/CD44V6	<100	77,1	45,3	0,144
	>100	73,2	21,0	

*Foram excluídos os casos sem informação.

5 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide de pênis aponta como sua maior implicação o acometimento de linfonodos loco regionais. Assim sendo, o entendimento dos mecanismos biomoleculares que possam estar envolvidos nos processos de invasão e disseminação metastática são de grande valia para a sua avaliação prognóstica.

Embora existam estudos envolvendo as proteínas do complexo CD44/ERM descritos na literatura, em diferentes tipos de câncer, no carcinoma de pênis ainda se encontram bastante escassos. Ademais, não há nenhum relato sobre o estudo da co-expressão das proteínas desse complexo nessa neoplasia.

CD44 é uma proteína de membrana que, além de estar envolvida na adesão celular, tem um importante papel no processo metastático. Estudos com câncer de mama, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, carcinoma oral e carcinoma epidermóide de esôfago demonstram um aumento significativo da expressão de CD44 e de suas isoformas (MANSOURI et al. 2015). Além disso, o valor prognóstico de CD44 tem sido relatado em cânceres como os de cólon, pulmão e mama (CHAI et al. 2014). Com o intuito de se avaliar o valor prognóstico da expressão de CD44 no carcinoma epidermóide de pênis, MINARDI et al. (2012 e 2015) demonstraram que a expressão de CD44 está presente tanto no epitélio normal, como no epitélio tumoral, sendo que no tecido tumoral ela se

apresenta comparativamente de maneira elevada. Os autores observaram conjuntamente que, no tumor, embora a imunorreatividade para CD44 seja mais evidente na membrana celular, também está presente no citoplasma. Essa deslocalização de CD44 para o citoplasma pode resultar em alterações nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, levando à redução da aderência (WALLACH-DAYAN et al. 2008) e, conseqüentemente, aumentando a motilidade, o que facilitaria a invasão de tecidos e a subsequente disseminação de células tumorais (MINARDI et al. 2012).

Nossos resultados contradizem os observados por MINARDI et al. (2012 e 2015), já que no tecido normal, oito em 10 casos apresentaram positividade em membrana, enquanto que no tecido tumoral, somente cinco em 76 casos foram positivos, exclusivamente em membrana, mesmo com nível de corte de 3%. Por outro lado, cerca da metade dos casos avaliados apresentaram positividade para a variante CD44V6, corroborando com ZHAO et al. (2015) que observaram uma maior expressão de CD44V6 em relação a CD44 no câncer colorretal esporádico.

Mesmo CD44 não desempenhando um papel muito claro na progressão tumoral, visto que alguns estudos associam a sua superexpressão à invasão tumoral e à disseminação metastática, enquanto que outros associam a sua perda de expressão à agressividade do tumor, nossos achados não correspondem a nenhum dado encontrado na literatura. Eventualmente, a fisiologia do pênis, e/ou o microambiente tumoral poderiam ser uma explicação plausível para este fato.

Sabe-se que as variantes de CD44, principalmente a isoforma CD44V6, estão dentre as moléculas responsáveis pela regulação dos processos de invasão tumoral, progressão e metástase (GÜNTHERT et al. 1991). Este fato dá-se pela capacidade que CD44V6 tem em promover a aderência de células cancerosas ao endotélio vascular e às membranas basais, e de aumentar a motilidade das células cancerosas (HARN et al. 1996; DONG et al. 2003; MARHABA e ZÖLLER 2004; KUHN et al. 2007). Ao contrário da forma padrão de CD44, a expressão de CD44V6 pode ser detectada apenas nos tecidos epiteliais, tais como epitélio escamoso, mioepitélio, ou nos pneumócitos do epitélio pulmonar e bronquiolar (HEIDER et al. 1995). Tem sido considerado como um fator prognóstico bastante útil em tumores de estômago, cabeça e pescoço, próstata e pulmão (ZHAO et al. 2015). Sua hiperexpressão foi observada em estudos com cânceres de cabeça e pescoço, esôfago, pele, pulmão (HEIDER et al. 2004), mama (KHAN et al. 2005; SALEH e RENO 2008) e leucemia (AKISIK et al. 2002). Com relação a sua contribuição ao acometimento linfonodal e prognóstico ruim, existem dados bastante controversos na literatura: TRAN et al. (1997) e MIYOSHI et al. (1997) encontraram envolvimento linfonodal em carcinoma de pulmão não pequenas células, apesar de não ter havido correlação significativa da hiperexpressão de CD44V6 com o estágio tumoral, recidiva e taxa de sobrevida; Da mesma forma, ZHAO et al. (2014), em seu estudo de metanálise para carcinoma de pulmão não pequena células, encontraram a hiperexpressão de CD44V6 como um fator prognóstico ruim; Já RAMASAMI et al. (2000), encontraram que a perda de expressão de CD44V6 leva a um

prognóstico ruim no pós operatório em adenocarcinoma pulmonar; Semelhantemente, SUZUKI e YAMASHIRO (2002) observaram que a perda de expressão de CD44V6 correlacionou-se significativamente com a invasão tumoral no adenocarcinoma de pulmão; SITU et al. (2010) observaram que a hiperexpressão de CD44V6 leva a um melhor prognóstico pré-operatório.

No presente estudo, a perda da expressão de CD44V6 correlacionou-se com a recidiva, contrariando os achados de ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIOU et al. (2014), que associaram a recidiva à alta expressão de CD44V6 no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, e indo de encontro com os achados de RAMASAMI et al. (2000) e de SUZUKI e YAMASHIRO (2002), que associaram a sua hipoexpressão com o prognóstico ruim.

As proteínas da família ERM (Ezrina, Radixina e Moesina) são componentes especializados da membrana celular que se ligam à actina e estão associados a moléculas de adesão, como CD44. Dentre suas atividades celulares estão a adesão, migração, invasão e sobrevivência (BRETSCHER et al. 2002; FIÉVET et al. 2002).

Envolvida no desenvolvimento e invasão do tumor, Ezrina é considerada uma proteína ao mesmo tempo efetora e reguladora de diversas vias de sinalização transducional (WAN et al. 2005). Sua hiperexpressão tem sido associada com o aumento do potencial metastático em diversos tumores como osteosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de pâncreas, ovário, endométrio e mama (ARSLAN et al. 2012), carcinoma epidermóide de esôfago (XIE et al. 2009), melanoma (FEDERICI et al.

2009), próstata e pulmão (PATARA et al. 2011). Em contrapartida, outros estudos associam a perda de expressão de Ezrina com a redução do potencial metastático no rabdomyosarcoma, osteosarcoma, e câncer de mama, sugerindo que esta proteína tem uma ação reguladora no efeito nocivo do câncer (PATARA et al. 2011). Da mesma forma como MINARDI et al. (2012) encontraram uma deslocalização de CD44 no carcinoma de pênis, DAVIES et al. (2006), PATARA et al. (2011) e ARSLAN et al. (2012) também observaram um aumento da expressão de Ezrina no citoplasma, associando este aumento à agressividade do tumor e a um pior prognóstico em câncer de cólon, adenocarcinoma colorretal e câncer de mama, respectivamente.

No entanto, em nosso estudo, a imunorreatividade de Ezrina foi observada na membrana, mostrando-se positiva em todos os casos de tecido normal e em apenas oito dos 76 casos de tecido tumoral avaliados. Como a positividade tumoral encontrada foi muito pequena e não houve nenhuma associação de Ezrina com os dados clínico patológicos, pode-se levar em consideração o envolvimento desta proteína como reguladora no efeito nocivo do câncer, sugerido por PATARA et al. (2011).

Identificada como uma proteína intracelular, sem sinalização ou sequência transmembrana (KOBAYASHI et al. 2003), Moesina, como membro da família ERM, também está envolvida no controle da adesão celular e nos processos de desenvolvimento tumoral e metástase, mostrando-se superexpressa em câncer de mama metastático e desregulada em cânceres de pior prognóstico (KOBAYASHI et al. 2004; CONDEELIS et al. 2005; CHARAFE-JAUFFRET et al. 2007). É encontrada

abundantemente nas células de pulmão e baço, e expressa em níveis mais baixos nas células renais. Normalmente, coexpressa-se com Ezrina e Radixina em diversos tipos celulares e se localiza nas saliências da superfícies das células, como as microvilosidades e filopodia, por exemplo (SATO et al. 1992; AMIEVA et al. 1995). Em um estudo imunistoquímico da epiderme normal, desenvolvido por ICHIKAWA et al. (1998), observou-se que a expressão membranosa de Moesina encontrava-se intensa na camada basal e diminuída em direção às camadas superficiais. Resultados semelhantes foram encontrados por KOBAYASHI et al. (2003) em células do epitélio oral normal.

ESTECHA et al. (2009) conduziram um estudo para avaliar o envolvimento de Moesina na invasão 3D de células tumorais de melanoma e identificaram que todas as linhagens de células invasivas analisadas expressavam mais Moesina do que Ezrina e Radixina. Eles observaram que a depleção de Moesina prejudica a capacidade das células de melanoma de invadir a matriz 3D e, assim, colonizar as células pulmonares, bem como a habilidade em ativar RhoA, proteína envolvida na regulação e no tempo da divisão celular, em resposta à adesão. Por fim, sugeriram que a Moesina desempenha um mecanismo de polaridade cortical que estimula a transição do tecido tumoral de sólido para fluido, favorecendo, dessa forma, o extravasamento de células circulantes durante o processo de metástase.

Em nosso estudo, Moesina, surpreendentemente, apresentou imunorretividade positiva somente no tecido tumoral, em cerca da metade dos casos, não se apresentando expressa nas margens adjacentes do

epitélio normal de pênis. Este fato corrobora com os achados de ICHIKAWA et al. (1998) e KOBAYASHI et al. (2003), e com os achados do estudo de proteômica do carcinoma de pênis conduzido por SILVA et al. (dados ainda não publicados) no A.C Camargo Cancer Center, o que veio frisar ainda mais o encontrado.

Na avaliação das proteínas co-expressas evidenciou-se a diminuição das relações Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6 comparadas às relações encontradas no tecido normal, verificando, dessa forma, a existência de uma desregulação das proteínas envolvidas no complexo, já que para a relação alterar o seu valor é necessário que uma proteína esteja aumentada ou diminuída em comparação a outra.

Sendo assim, observou-se que o aumento da relação Ezrina/CD44(HCAM) associou-se significativamente ao tamanho do tumor e à infiltração de corpo cavernoso, enquanto que a sua diminuição associou-se significativamente com a recidiva. De maneira semelhante, a diminuição das relações Ezrina/CD44V6 e Moesina/CD44(HCAM) associaram-se significativamente com a recidiva. Além disso, a invasão de corpo cavernoso mostrou ter um valor preditivo na recidiva do carcinoma de pênis em pacientes com a relação de Ezrina/CD44(HCAM) superior a 100.

A transição epitélio-mesênquima (EMT) é um mecanismo transcricional e morfológico que ocorre durante o desenvolvimento e remodelamento de tecidos normais, e na progressão de doenças como o câncer. Como se trata de um processo de plasticidade epitelial, ocorre

quando as adesões célula-célula se desfazem e, então, o citoesqueleto de actina se reorganiza de forma que as células passam a adquirir um aumento nos contatos célula-matriz, ganhando, assim, capacidade migratória e invasiva (XU et al. 2009; YILMAZ e CHRISTOFORI 2009). No estudo elaborado por HAYNES et al. (2011), constatou-se que há uma diminuição de Ezrina e uma hiperexpressão de Moesina durante a EMT, promovendo a montagem, organização e estabilidade das fibras espessas de actina, o que a torna essencial para um EMT eficiente. Além disso, eles observaram que diminuindo-se ligeiramente a expressão de Moesina, atenua-se o aumento da expressão de CD44 no EMT.

JUNG et al. (2013) estudou a expressão de Moesina e CD44 no adenocarcinoma gástrico e observou que, diferentemente de Moesina, que teve sua hiperexpressão como um valor preditivo para metástase linfonodal, a expressão de CD44 não se correlacionou com nenhuma variável clinicopatológica e nem com a expressão de Moesina. DESOUZA et al. (2013) encontraram uma co-expressão aumentada tanto de Moesina, como de CD44 em células de glioma tratadas com ácido hialurônico, sugerindo que a interação CD44-Moesina pode ser responsável pelo aumento de células migratórias.

Diante disso, podemos inferir que a invasão tumoral parece estar relacionada com a modelagem do processo de infiltração celular, o que seria melhor elucidado em um estudo levando-se em conta os aspectos funcionais das proteínas do complexo CD44/ERM.

6 CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Embora o estudo apresente associações significativas com a recidiva, não se pode afirmar que isso seja decorrência da alteração ou não da adesão celular promovida pelo complexo CD44/ERM.
- As relações obtidas para Ezrina/CD44(HCAM), Ezrina/CD44V6, Moesina/CD44(HCAM) e Moesina/CD44V6 mostraram-se diminuídas, comparadas às relações apresentadas no tecido normal.
- Moesina não é expressa no epitélio normal de pênis, estando presente somente no tecido tumoral.
- A infiltração de Corpo Cavernoso tem um valor preditivo na recidiva do carcinoma de pênis em pacientes com a relação de Ezrina/CD44(HCAM) superior a 100.
- Apesar das associações demonstradas, não é possível se traduzir o teste de co-expressão de CD44/ERM como fator prognóstico ou preditivo de metástases linfonodais no carcinoma epidermóide de pênis

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Akisik E, Bavbek S, Dalay N. CD44 variant exons in leukemia and lymphoma. **Pathol Oncol Res** 2002; 8:36-40.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed; 2004. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular; p.1055-117.

Amieva MR, Furthmayr H. Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts. **Exp Cell Res** 1995; 219:180-96.

Andrade JB. **Correlação clínico-patológica da expressão protéica do complexo CD44/ERM (Ezrina/Radixina/Moesina) no carcinoma de pênis**. São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Arslan AA, Silvera D, Arju R, et al. Atypical ezrin localization as a marker of locally advanced breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 134:981-8.

Athanassiou-Papaefthymiou M, Shkeir O, Kim D, et al. Evaluation of CD44 variant expression in oral, head and neck squamous cell carcinomas using a triple approach and its clinical significance. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2014; 27:337-49.

Ayhan A, Tok EC, Bildirici I. Overexpression of CD44 variant 6 in human endometrial cancer and its prognostic significance. **Gynecol Oncol** 2001; 80:355-8.

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

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

Bretscher A. Purification of a 80,000-D protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. **J Cell Biol** 1983; 97:425-32.

Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:586-99.

Brinton LA, Li JY, Rong SD, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Brumini R. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-80**. Rio de Janeiro: Campanha Nacional de Combate ao Câncer-Ministério da Saúde; 1982. Câncer de pênis; p.118-9.

Campos RSM, 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.

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

Chai L, Liu H, Zhang Z, et al. CD44 expression is predictive of poor prognosis in pharyngolaryngeal cancer: systematic review and meta-analysis. **Tohoku J Exp Med** 2014; 232:9-19.

Charafe-Jauffret E, Monville F, Bertucci F, et al. Moesin expression is a marker of basal breast carcinomas. **Int J Cancer** 2007; 121:1779-85.

Chaux A, Soares F, Rodrigues I, et al. Papillary squamous cell carcinoma, Not Otherwise Specified (NOS) of the penis: clinicopathologic features, differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **Am J Surg Pathol** 2010a; 34:223-30.

Chaux A, Tamboli P, et al. Warty-basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm. Report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010b; 23:869-904.

Chaux A, Soares FA, da Cunha IW, et al. Penile squamous cell carcinomas: preferential association of human papillomavirus with high histological grade. **Modern Pathol** 2011; 24(Supp1):184a. [Presented at USCAP 100th Annual Meeting; 2011 Febr 28-March 2; San Antonio, Tx, United States]

Choi SH, Takahashi K, Eto H, Yoon SS, Tanabe KK. CD44s expression in human colon carcinomas influences growth of liver metastases. **Int J Cancer** 2000; 85:523-6.

Condeelis J, Singer RH, Segall JE. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2005; 21:695-718.

Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, Ayala G, Roveros M. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:753-63.

Cubilla AL, Ayala MT, Barreto J, Bellasai J, Noel JC. Surface adenosquamous carcinoma of the penis: a report of three cases. **Am J Surg Pathol** 1996; 20:156-60.

Cubilla AL, Dillner J, Schellhamer PF, et al. Tumors of the penis: pathology and genetics: malignant epithelial tumors. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors. **Tumors of the urinary system and male genital organs**. Lyon: WHO, IARC Press; 2004. p.280-98. (World Health Organization Classification of Tumours; n. 6).

Cunha IW, Guimarães GC, Soares FA, et al. Pseudoglandular (adenoid, acantholytic) penile squamous cell carcinoma: a clinicopathologic and outcome study of 7 patients. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:551-5.

Davies ML, Rmali K, Parr C, Hiscox S, Jiang WG. Loss of cellular distribution of ezrin in human colon cancer. In: **ASCO 2006 Gastrointestinal Cancers Symposium**; 2006 Jan 26-28; San Francisco-USA; 2006. p.322.

Dekernion JB, Tynberg P, Persky L, Fegen JP. Carcinoma of the penis. **Cancer** 1973; 32:1256-62.

Derrick FC Jr, Lynch KM Jr, Kretkowski RC, Yarbrough WJ. Epidermoid carcinoma of the penis: computer analysis of 87 cases. **J Urol** 1973; 110:303-5.

DeSouza LV, Matta A, Karim Z, et al. Role of moesin in hyaluronan induced cell migration in glioblastoma multiforme. **Mol Cancer** 2013; 12:74.

Dong WG, Sun XM, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites. **World J Gastroenterol** 2003; 9:2596-600.

Estecha A, Sánchez-Martín L, Puig-Kröger A, et al. Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. **J Cell Sci** 2009; 122:3492-501.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio JBS, Glina S. Epidemiologic study of penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-93.

Federici C, Brambilla D, Lozupone F, et al. Pleiotropic function of ezrin in human metastatic melanomas. **Int J Cancer** 2009; 124:2804-12.

Fiévet B, Louvard D, Arpin M. ERM proteins in epithelial cell organization and functions. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1773:653-60.

Foekens JA, Dall P, Klijn JG, et al. Prognostic value of CD44 variant expression in primary breast cancer. **Int J Cancer** 1999; 84:209-15.

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

Goldstein LA, Zhou DFH, Picker LJ, et al. A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. **Cell** 1989; 56:1063-72.

Goodfellow PN, Banting G, Wiles MV, et al. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. **Eur J Immunol** 1982; 12:659-63.

Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. **J Clin Pathol Mol Pathol** 1999; 52:189-96.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. **Urology** 2006; 68:148-53.

Guimarães GC, Leal LM, Campos RS, et al. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology** 2007; 70:137-142.

Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, et al. Penile squamous cell carcinoma. Clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34.

Guimarães GC, Rocha RM, Zequi SC, Cunha IW, Soares FA. Penile Cancer: Epidemiology and Treatment. **Curr Oncol Rep** 2011; 13:231-9.

Günthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. **Cell** 1991; 65:13-24.

Harn HJ, Ho LI, Shyu RY, et al. Soluble CD44 isoforms in serum as potential markers of metastatic gastric carcinoma. **J Clin Gastroenterol** 1996; 22:107-10.

Harrison GM, Davies G, Martin TA, Jiang WG, Mason MD. Distribution and expression of CD44 isoforms and Ezrin during prostate cancer-endothelium interaction. **Int J Oncol** 2002; 21:935-40.

Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T e Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. **Mol Biol Cell** 2011; 22:4750-64.

Heider KH, Mulder JW, Ostermann E, et al. Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumour cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys. **Eur J Cancer** 1995; 31A:2385-91.

Heider KH, Kuthan H, Stehle G, Munzert G. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother** 2004; 53:567-79.

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behavior? **Br Med J** 1987; 1295:1306-8.

Hofmann M, Rudy W, Zoller M, et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. **Cancer Res** 1991; 51:5292-7.

Huang HY, Li CF, Fang FM, et al. Prognostic implication of ezrin overexpression in myxofibrosarcomas. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:3212-9.

Ichikawa T, Masumoto J, Kaneko M, Saida T, Sagara J, Taniguchi S. Expression of moesin and its associated molecule CD44 in epithelial skin tumors. **J Cutan Pathol** 1998; 25:237-43.

Ishibashi M, Nishida T, Murakami H, Shiraishi M, Aritomi T, Yoshida M. The role of interstitial hyaluronan in acute lung injury [abstract]. **Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi** 1995; 33:225-30.

Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. **Surg Today** 2000; 30:28-32.

Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization. **J Urol** 1993; 149:59-63.

Jalkanen ST, Bargatze RF, Herron LR, Butcher EC. A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelium recognition and lymphocyte homing in man. **Eur J Immunol** 1986; 16:1195-202.

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

Johnson TL, Kim W, Plieth DA, Sarkar FH. Detection of HPV 16/18 DNA in cervical adenocarcinoma using polymerase chain reaction (PCR) methodology. **Mod Pathol** 1992; 5:35-40.

Jung WY, Kang Y, Lee H, et al. Expression of moesin and CD44 is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. **Histopathology** 2013; 63:474-81.

Junqueira LC, Carneiro J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. Membrana plasmática: digestão intracelular; p.94-100.

Kang YK, Hong SW, Lee H, Kim WH. Prognostic implications of ezrin expression in human hepatocellular carcinoma. **Mol Carcinog** 2010; 49:798-804.

Khan SA, Cook AC, Kappil M, et al. Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, post-translational regulation. **Clin Exp Metastasis** 2005; 22:663-73.

Kim H, Yang XL, Rosada C, Hamilton SR, August JT. CD44 expression in colorectal adenoma is an early event occurring prior to K-ras and p53 gene mutation. **Arch Biochem Biophys** 1994; 310:504-7.

Kobayashi H, Sagara J, Masumoto J, Kurita H, Kurashina K, Taniguchi S. Shifts in cellular localization of moesin in normal oral epithelium, oral epithelial dysplasia, verrucous carcinoma and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2003; 32:344-9.

Kobayashi H, Sagara J, Kurita H, et al. Clinical significance of cellular distribution of moesin in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:572-80.

Koopman G, Heider KH, Horst E, et al. Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. **Exp Med** 1993; 177:897-904.

Korkeila EA, Syrjänen K, Bendardaf R, et al. Preoperative radiotherapy modulates ezrin expression and its value as a predictive marker in patients with rectal cancer. **Human Pathol** 2010; 42:384-92.

Kuhn S, Koch M, Nübel T, et al. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. **Mol Cancer Res** 2007; 5:553-67.

Kurozumi K, Nishida T, Nakao K, Nakahara M, Tsujimoto M. Expression of CD44 variant 6 and lymphatic invasion: importance to lymph node metastasis in gastric cancer. **World J Surg** 1998; 22:853-7; discussion 857-8.

Lankes W, Griesmacher A, Grunwald J, Schwatz-Albiez R, Keller R. A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation. **Biochem J** 1988; 251:831-42.

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

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Oncologia cirúrgica. **Acta Oncol Bras** 1993; 13:2-3.

Lopes A, Rossi BM, Fonseca FP, Morini S. Unreliability of modified inguinal lymphadenectomy for clinical staging of penile carcinoma. **Cancer** 1996; 77:2099-102.

Lopes A, Bezerra ALR, Pinto CAL, Serrano SV, Mello CA, Villa LL. P53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **J Urol** 2002; 168:81-6.

Maden C, Sherman KJ, Beckman AM, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and the risk of penile cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:19-24.

Mansouri A, Foroughmand AM, Abbaszadegan MR, Memar B, Mahmoudian RA, Gholamin M. Expression analysis of *CD44* isoforms S and V3, in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Iran J Basic Med Sci** 2015; 18:380-384.

Manten-Horst E, Danen EH, Smit L, et al. Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. **Int J Cancer** 1995; 64:182-8.

Marhaba R, Zöllner M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. **J Mol Histol** 2004; 35:211-31.

Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. **Crit Rev Oncol Hematol** 2003; 46:165-86.

Minardi D, Lucarini G, Filosa A, et al. Prognostic value of CD44 expression in penile squamous cell carcinoma: a pilot study. **Cell Oncol** 2012; 35:377-84.

Minardi D, Lucarini G, Simonetti O, Di Primio R, Montironi R, Muzzonigro G. Is it possible to predict the need of inguinal lymphadenectomy in patients with squamous cell carcinoma of the penis? A clinical and a pathological study. **Arch Ital Urol Androl** 2015; 87:33-7.

Misra S, Heldin P, Hascall VC, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. **FEBS J** 2001; 278:1429-43.

Miyoshi T, Kondo K, Hino N, Uyama T, Monden Y. The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 1997; 3:1289-97.

Mosconi AM, Roila F, Gatta G, Theodore C. Cancer of the penis. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 53:165-77.

Naor D, Sionov RV, Zahalka M, Rochman M, Holzmann B, Ish-Shalom D. Organ-specific requirements for cell adhesion molecules during lymphoma cell dissemination. **Curr Top Microbiol Immunol** 1998; 231:143-66.

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

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

Ochiai S, Nakanishi Y, Mizuno K, et al. Expression of CD44 standard and CD44 variant 6 in human lung cancer [abstract]. **Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi** 1997; 35:1179-85.

Patara M, Santos EM, Coudry Rde A, Soares FA, Ferreira FO, Rossi BM. Ezrin expression as a prognostic marker in colorectal adenocarcinoma. **Pathol Oncol Res** 2011; 17:827-33.

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

Percy CL, Miller BA, Gloeckler-Ries LA. Effect of changes in cancer classification and the accuracy of cancer death certificates on trends in cancer mortality. **Ann NY Acad Sci** 1990; 609:87-97.

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

Pakkanen R, Hedman K, Turunen O, Wahlstrom T, Vaheri A. Microvillus-specific Mr 75,000 plasma membrane protein of human chorio-carcinoma cells. **J Histochem Cytochem** 1987; 135:809-16.

Pompeu ACL. **Linfadenectomia inguinal estagiada em câncer de pênis: avaliação prospectiva de 50 pacientes**. São Paulo; 1993. [Tese de Livre-Docência-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-USP].

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

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

Ramasami S, Kerr KM, Chapman AD, King G, Cockburn JS, Jeffrey RR. Expression of CD44v6 but not E-cadherin or beta-catenin influences prognosis in primary pulmonary adenocarcinoma. **J Pathol** 2000; 192:427-32.

Rosemberg SK. Sexually transmitted papillomaviral infection in men: an update. **Dermatol Clin** 1991; 9:317-31.

Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. **J Clin Mol Pathol** 1997; 50:57-71.

Saleh F, Reno W. Invasive cribriform breast carcinomas in patients with grade 1 and stage IIA (T2 N0 M0) breast cancer strongly express the v3 and v6, but not the v4 isoforms of the metastatic marker CD44. **Neoplasma** 2008; 55:246-55.

Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. **J Cell Sci** 1992; 103:131-43.

Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor: comparison of all 10 variable exons between mouse, human and rat. **J Biol Chem** 1993; 268:12235-8.

Silva AMT. **Estudo da expressão protéica da família ErbB no carcinoma peniano**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Situ D, Long H, Lin P, et al. Expression and prognostic relevance of CD44v6 in stage I non-small cell lung carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:1213-9.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and-9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Stamenkovic I, Amior M, Pesando JM, et al. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. **Cell** 1989; 56:1057-62.

Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, et al. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. **EMBO J** 1991; 10:343-8.

Sufrin G, Huben R. Benign and malignant lesions of the penis. In: Gillewnateer JY, editor. **Adult and pediatric urology**. 2nd ed. Chicago: Year Book Medical; 1987. p.1462-3.

Suzuki H, Yamashiro K. Reduced expression of CD44 v3 and v6 is related to invasion in lung adenocarcinoma. **Lung Cancer** 2002; 38:137-41.

Terpe HJ, Koopman R, Imhof BA, Günthert U. Expression of integrins and CD44 isoforms in non-Hodgkin's lymphomas: CD44 variant isoforms are preferentially expressed in high-grade malignant lymphomas. **J Pathol** 1994; 174:89-100.

Tran TA, Kallakury BV, Sheehan CE, Ross JS. Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. **Hum Pathol** 1997; 28:809-14.

Trapasso A, Allegra E. Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. **Biologics** 2012; 6:379-83.

Tsukita SH, Itoh M, Tsukita SA. A new 400-kD protein from isolated adherens junctions: its localization at the undercoat of adherens junctions and at microfilament bundles such as stress fibers and circumferential bundles **J Cell Biol** 1989; 109:2905-15.

Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. **J Cell Biol** 1994; 126:391-401.

Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, et al. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: A study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. **Hum Pathol** 1991; 22:908-13.

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

Velazquez EF, Melamed J, Barreto JE, Agüero F, Cubilla AL. Sarcomatoid carcinoma of the penis: a clinicopathologic study of 15 cases. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1152-8.

Velazquez EF, Soares FA, Cunha IW, Lopes A, Barreto JE, Cubilla AL. Penile verruciform tumors: extended classification, differential diagnosis and outcome in 104 cases. **Lab Invest** 2007; 87:182A.

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

Velazquez E, Ayala G, Liu H, et al. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10mm. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:974-9.

Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell Res** 2009; 19:156-72.

Wallach-Dayán SB, Rubinstein AM, Hand C, Breuer R, Naor D. DNA vaccination with CD44 variant isoform reduces mammary tumor local growth and lung metastasis. **Mol Cancer Ther** 2008; 7:1615-23.

Wan X, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. **Cancer Res** 2005; 65:2406-11.

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

Wayner EA, Carter WG, Piotrowicz RS, Kunicki TJ. The function of multiple extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins I_c-II_a. **J Cell Biol** 1988; 107:1881-91.

Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, Yu L, Liu ET, Walther PJ. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. **Int J Cancer** 1992; 50:694-701.

Wiener JS, Walther PJ. The association of oncogenic human papillomaviruses with urologic malignancy: the controversies and clinical implications. **Surg Oncol Clin N Am** 1995; 4:257-76.

Xie JJ, Xu LY, Xie YM, et al. Roles of ezrin in the growth and invasiveness of esophageal squamous carcinoma cells. **Int J Cancer** 2009; 124:2549-58.

Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:15-33.

Zequi SC, Guimarães GC, da Fonseca FP, et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer. A multicenter study. **J Sex Med** 2012; 9:1860-7.

Zhai JW, Yang XG, Yang FS, Hu JG, Hua WX. Expression and clinical significance of Ezrin and E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. **Chin J Cancer** 2010; 29:317-20.

Zhao S, He JL, Qiu ZX, et al. Prognostic value of CD44 variant exon 6 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:6761-6.

Zhao LH, Lin QL, Wei J, Huai YL, Wang KJ, Yan HY. CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:692-701.

Zhou DF, Ding JF, Picker LJ, Bargatze RF, Butcher EC, Goeddel DV. Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. **J Immunol** 1989; 143:3390-5.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP

São Paulo, 26 de Maio de 2011.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

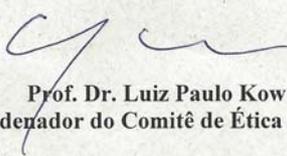
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1559/11
“Co-expressão de CD44 e proteínas da família ERM (Ezrina/moesina) no carcinoma de
pênis”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/05/2011, **aprovaram** a realização do estudo em referência, datado de 19 de abril de 2011 (versão 1) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Justificativa para solicitação de financiamento do projeto;
- Declaração de Infraestrutura e instalações;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à
assistente do CEP dentro de 12 meses.**

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1