

**IMUNOEXPRESSÃO E VALOR
PROGNÓSTICO DE CD9 NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE PÊNIS**

LUIZ RENATO MONTEZ GUIDONI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Guidoni, Luiz Renato Montez

Imunoexpressão e valor prognóstico de CD9 no carcinoma epidermóide de pênis / Luiz Renato Montez Guidoni – São Paulo, 2010.
101p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DO PÊNIS. 2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 3. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 4. PROGNÓSTICO. 5. LINFADENCTOMIA. 6. TETRASPANINAS. 7. ANTÍGENO CD9.

DEDICATORIA

A meus amados pais, Antonio Carlos e Solange, por dedicarem suas vidas aos seus filhos, dando bons exemplos, educação e apoio total e irrestrito em todos os momentos. É contagiante a alegria dessas duas pessoas maravilhosas a cada conquista de seus filhos!

Aos meus irmãos, Carlinhos e Angélica, pela amizade e carinho ao caçula, que aos poucos vai crescendo.

A Renata, minha alma gêmea, futura esposa, pelo amor, incentivo e paciência. Sua companhia me fortalece e dá tranquilidade para ultrapassar qualquer obstáculo.

Aos avós, Inah, Catão, Elga (i.m.), Gino (i.m.), pelo carinho recebido desde a infância.

A amiga Luzia, pelo carinho e apoio há mais de 20 anos.

A todas as pessoas especiais da minha família que contribuíram nesses 31 anos de vida.

Aos pacientes do Hospital do Câncer e da Santa Casa de São Paulo, pelas várias lições de vida ao longo desses 14 anos de vida médica, além de tornar possível a minha formação médica e o avanço da ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica e da Pós Graduação, meu orientador e grande incentivador, pela confiança depositada, dedicação, eficiência e ensinamentos na elaboração desta dissertação. Um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, pela eficiência, dedicação, que tornou possível este trabalho.

A Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, que tornou possível a minha vinda para esse grupo fantástico de pessoas e pesquisadores no Hospital do Câncer. Pela amizade, ajuda, ensinamentos e incentivo desde o início até o final desta realização, principalmente na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica, pela sua amizade, incentivo e apoio em todas as minhas tarefas científicas.

Ao Dr. Francisco Paulo da Fonseca, médico titular do Departamento de Cirurgia Pélvica, pelos contantes ensinamentos e pelo exemplo de dedicação.

Ao Hospital A.C. Camargo, excelência em ensino e pesquisa, instituição que prima não apenas pela docência, mas também pelo alto nível das suas publicações internacionais.

Ao Prof. Dr. Marjo Perez, Chefe do Serviço de Urologia da Disciplina de Cirurgia da Santa Casa de São Paulo, pelo apoio e confiança ao longo da minha caminhada.

Ao Dr. Roni de Carvalho Fernandes, Assistente do Serviço de Urologia da Disciplina de Cirurgia da Santa Casa de São Paulo, pela competência, relação médico-paciente e chefe-residente primorosa e dedicação admirável. Foi fundamental na minha formação médica e urológica, incentivando e apoiando as escolhas na faculdade, residência e pós-residência. Pelo elo com os médicos do Hospital do Câncer que me possibilitaram essa realização.

A Santa Casa de São Paulo, seus professores e preceptores, onde desde 1997, fui calorosamente acolhido, uma escola médica completa, em termos éticos, técnicos e principalmente, sociais. Muito obrigado por me ensinar uma medicina verdadeira, diferente e atualizada.

Aos amigos companheiros de faculdade e residência, Dr. Rodrigo Contrera do Rio, Dr. Daniel Ossamu, Dr. Pedro Varella, Dr. Sergio Ortiz, Dr. Sérgio Yoda Horita, Dr. Álvaro Pentagna, Dra. Tatiana Assunção, Dra. Thais Helena Matsuda, Dr. Daniel Hideo, Dra. Luciana Digieri, Dra. Stella Velásquez, Dra. Carolina Sivieri, Dr. Henrique Lamego e Dr. Fernando Três Silveira, pela amizade e apoio mesmo nas piores provas e plantões.

Aos companheiros de residência e amigos nas horas mais difíceis, Dr. Andreas Koszka, Dr. Caio Aquino, pela amizade e carinho, além do serviço de despertador por alguns anos.

Ao Dr. André Ibrahim David e sua esposa Milene Cury, pela amizade, carinho e por me “adotarem” desde o início da formação médica.

Ao colega e amigo Artur Ramos Moreno, pelo companheirismo, amizade, e compreensão, principalmente nos últimos meses desse trabalho.

Aos amigos e companheiros de trabalho, Dr. Antonio João de Aquino, Dr. Walter Henriques, Dr. Gilvan Ferreira, Dr. Fernando Korkes, Dr. Deusdedit Cortez Vieira da Silva Neto, Dr. Ravenda Ryan Moniz, Dr. André Costa Mattos, Dr. Rafael Radaelli, Dr. Hallison Costa, Dr. Mauricio Akira, Dr. Rui Wanderley Mascarenhas pela ajuda, apoio e amizade.

Aos colegas, Dr. Moacyr Fucs, Dr. Silvio da Ressureição Pires, Dr. Dalmo de Barros, Dr. Márcio Rosa Pagan, Dr. Cristian Fuhro, Dr. Celso de Oliveira, Dr. Ricardo Léo Roberto Felts De La Roca, Dr. Lívio Beneduzzi, Dr. Alex Menezes, Dr. Júlio Máximo, Dr. Marcos Bróglia, Dr. Rodrigo Wilson, Dra. Isabel Cristina de Albuquerque Feitosa, Dr. Gustavo Cuck, Dr. Luis Gustavo de Morato Toledo, Dr. Adalberto Andriolo Junior, pelos ensinamentos fundamentais à minha formação e pelo apoio.

Aos Professores Dr. Luiz Arnaldo Szutan e Dr. Miguel Russo Jr., pela amizade e todos os ensinamentos que colaboraram muito em minha formação.

Ao colega e amigo Dr. Hamilton Brasil, pela amizade e confiança.

Aos companheiros e funcionários do Hospital Geral de Guarulhos e do Hospital São Luiz, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos grandes velhos amigos Dr. Marcello Souza Silva, Dr. Leonardo del Grande, Dr. Mauro Penteado, Dr. Tadeu Colens Ourivio e Dr. Fernando Conde pela amizade e momentos inesquecíveis.

Ao Dr. Rafael Malogoli, Ivan Neves, Carlinhos e Severino, do laboratório de patologia do Hospital AC Camargo, pela amizade e fundamental ajuda na realização desse trabalho.

As colegas de pós graduação Alice Muglia, Maria José Souza, Mariana Ikoma, Andrezza Viviany, Flávia Bortolotto, Cecília Feio e Adriana Moreira, pela amizade e apoio nesses dois anos de novos desafios.

A Sra. Hirde Contesini, pela colaboração, dedicação primorosa e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

A Sra. Liliane Cilento, secretária do Departamento de Anatomia Patológica, pelo apoio sempre bem humorado nesses dois anos de convivência.

A Sra. Suely Francisco, bibliotecária do Hospital A.C. Camargo, pelas sugestões, orientações e revisão desta dissertação. Pela simpatia e atenção que exaltam ainda mais as suas qualidades.

A biblioteca do Hospital do Câncer e todos os funcionários, pela incansável busca pelos artigos mais difíceis, de forma eficiente e amigável.

A Sra. Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Ana Maria Kunari da pós graduação do Hospital A.C. Camargo, pelo cuidado, organização e competência.

Agradeço especialmente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio no Projeto Temático processo Fapesp: 2009/52088-3 “O carcinoma de pênis: estudo de um problema brasileiro abordando da morfologia aos mecanismos moleculares”

RESUMO

Guidoni LRM. **Imunoexpressão e valor prognóstico de CD9 no carcinoma epidermóide de pênis**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer de pênis é um importante problema de saúde, podendo, em alguns países em desenvolvimento, chegar até a 20% das neoplasias no homem. O principal tipo histológico é o carcinoma espinocelular, responsável por até 95% dos casos de câncer de pênis. O tratamento padrão é a amputação do tumor primário e na linfadenectomia regional. A baixa acurácia dos métodos de estadiamento da doença linfonodal, que no momento é o fator prognóstico mais importante e a alta taxa de morbidade da linfadenectomia tem estimulado o estudo de novos fatores prognósticos preditivos de metástases em linfonodos, facilitando a seleção de pacientes a serem submetidos à linfadenectomia. **Objetivos:** O presente estudo visa estudar a expressão imunoistoquímica de CD9 no carcinoma peniano, além de identificar o valor prognóstico dessa expressão correlacionando-a com o tumor primário no risco de metástase linfonodal e a relação destes com as variáveis clínicas, demográficas e anatomopatológicas, bem como sua relação com sobrevida livre de doença e global. **População e Métodos:** Foram avaliados retrospectivamente, 67 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide do pênis submetidos ao tratamento do tumor primário e a linfadenectomia radical ou aqueles submetidos ao tratamento do tumor primário, não linfadenectomizados, com pelo menos cinco anos de seguimento. **Resultados:** A expressão de CD9 está aumentada nos carcinomas in situ e na uretra normal. Nos tecidos normais e nos tumores invasivos a expressão foi variada. A expressão de CD9 esteve associada direta e significativamente com a invasão perineural e a embolização angiolinfática. Quando analisado metástase linfonodal, não houve diferença significativa com a expressão dessa tetraspanina. O aumento da expressão de CD9 mostrou tendência a significância quando associado a pior sobrevida global e câncer específica. A infiltração perineural e metástase linfonodal foram os fatores independentes de pior sobrevida global e específica. **Conclusão:** O aumento da expressão de tetraspanina pode indicar pior prognóstico.

SUMMARY

Guidoni LRM. **[Immunoexpression and prognostic value of CD9 in epidermoid carcinoma of the pênis]**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Cancer of the penis is a major health problem and in some developing countries accounts for 20% of neoplasia in males. The main histological type is spinocellular carcinoma, which is responsible for up to 95% of penile cancer cases. Standard treatment is the surgical removal, amputation of the primary tumor and regional lymphadenectomy. The poor accuracy of the staging method for lymph node disease, which currently is the most important prognostic factor, and the high rate of lymphadenectomy morbidity stimulated the study of new predictive and prognostic factors of lymph node metastases that can help selecting patients for lymphadenectomy. **Objectives:** This study aims at the immunohistochemical expression of CD9 in penile carcinoma, identifying its prognostic value in relation to the primary tumor and the risk for lymph node metastases with their correlation to clinical, demographic and pathological variables as well to disease free survival and overall survival. **Population and Methods:** An assessment was performed of 67 patients with penile spinocellular carcinoma, who had undergone primary tumor treatment followed by radical lymphadenectomy or who had undergone primary tumor treatment with no lymphadenectomy and at least a five-year follow up. **Results:** There was a increased CD9 expression in normal urethra and in situ carcinoma. This expression was varied in normal tissue and invasive tumors. CD9 expression was direct and significantly associated with perineural invasion and angiolymphatic embolization. When analyzed lymph node metastasis, there was no significant difference with the expression of this tetraspanina. Poor overall and specific cancer survival is related to increased expression of CD9, with a tendency to significance. The perineural infiltration and lymph node metastasis were independent factors of poor overall and specific cancer survival. **Conclusion:** The increased expression of tetraspanina may indicate poor prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático da estrutura da tetraspanina.....	23
Figura 2	Caracterização do estadiamento clínico T dos 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis.....	37
Figura 3	Caracterização do estadiamento clínico N dos 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis.....	38
Figura 4	Gráfico demonstrando a expressão de CD9 (em %) em uretra, tecido peniano normal, tecido peniano hiperplasiado, carcinoma in situ peniano e tumor peniano invasivo.....	50
Figura 5	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para o CD9.....	51
Figura 6	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva para o CD9.....	51
Figura 7	Fotomicrografia de carcinoma in situ do pênis com marcação positiva para CD9.....	52
Figura 8	Fotomicrografia de uretra com marcação positiva para CD9.....	52
Figura 9	Fotomicrografia de hiperplasia com marcação positiva para CD9.....	53
Figura 10	Fotomicrografia de mucosa peniana com leve displasia com marcação positiva para CD9.....	53

Figura 11	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa e uretra normal com marcação positiva pelo CD9.....	54
Figura 12	Curva de sobrevida câncer específica para os 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.....	59
Figura 13	Curva de sobrevida Global para os 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.....	63

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Quadro 1	TNM - Estadiamento TNM.....	10
Tabela 1	Tabela demonstrando o tamanho e a genética das tetraspaninas humanas.....	24
Tabela 2	Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	36
Tabela 3	Número e porcentagem de pacientes segundo estadiamento clínico T e N dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	37
Tabela 4	Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 32 pacientes portadores de câncer de pênis.....	39
Tabela 5	Situação clínica dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.....	40
Tabela 6	Frequência de variáveis anatomopatológicas do tumor primário dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	42
Tabela 7	Expressão de CD9 segundo variáveis clínicas e demográficas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	47
Tabela 8	Expressão de CD9 segundo variáveis anatomopatológicas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	48
Tabela 9	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	49
Tabela 10	Variáveis independentes relacionadas com aumento da expressão de CD9 em 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	49

Tabela 11	Expressão de CD9 em casos de CEC de pênis.....	50
Tabela 12	Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	55
Tabela 13	Status linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímica dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano...	57
Tabela 14	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	58
Tabela 15	Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal em 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	58
Tabela 16	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	60
Tabela 17	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 10 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	61
Tabela 18	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	62
Tabela 19	Modelo multivariado para a sobrevida câncer específica em pacientes portadores de carcinoma peniano em 67 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	63
Tabela 20	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	64
Tabela 21	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 10 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	65

Tabela 22	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada.....	66
Tabela 23	Risco de óbito em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CEC	Carcinoma Espinocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HE	hematoxilina-eosina
HPV	Papiloma Vírus Humano
LS	Linfonodo Sentinela
RNA	Ácido ribonucleico
TNM	Estadio do tumor primário (T), presença de linfonodos positivos (N) e metástase (M)
OMS	Organização Mundial de Saúde

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Etiologia.....	2
1.3	Aspectos clínicos.....	4
1.4	Diagnóstico e avaliação linfonodal	6
1.5	Estadiamento.....	8
1.6	Aspectos terapêuticos.....	11
1.7	Fatores prognósticos	14
1.8	Tetraspaninas	19
1.9	Considerações finais	22
2	OBJETIVOS.....	25
3	POPULAÇÃO E MÉTODOS	26
3.1	População de estudo.....	26
3.1.1	Crítérios de inclusão.....	26
3.1.2	Crítérios de exclusão.....	27
3.2	Metodologia	27
3.2.1	Diagnóstico	28
3.2.2	Estadiamento.....	28
3.2.3	Procedimento cirúrgico	28
3.2.4	Seguimento dos pacientes	29
3.2.5	Exame anatomopatológico do tumor primário.....	30
3.2.6	Técnica de imunoistoquímica	33
3.3	Casuística	35
3.3.1	Aspectos imunoistoquímicos	35
3.3.2	Aspectos epidemiológicos e clínicos	38
3.3.3	Aspectos anatomopatológicos.....	41
3.4	Análise estatística.....	43

3.5	Análise de risco e aspectos éticos	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Imunoistoquímica de CD9	46
4.1.1	Análise univariada.....	46
4.1.2	Análise univariada.....	48
4.1.3	Avaliação da expressão de cd9 na progressão tumoral.....	49
4.2	Avaliação do risco de metástases linfonodais.....	55
4.2.1	Análise univariada.....	55
4.2.2	Análise multivariada	58
4.3	Análise de sobrevida	59
4.3.1	Sobrevida câncer específica	59
4.3.2	Sobrevida Global.....	63
5	DISCUSSÃO.....	67
5.1	Aspectos gerais	67
5.2	Aspectos imunoistoquímicos	77
5.3	Análise da sobrevida	78
5.3.1	Sobrevida Câncer Específica	78
5.3.2	Sobrevida Global.....	79
6	CONCLUSÕES.....	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ANEXOS

Anexo 1 Classificação histológica de Câncer de Pênis (OMS)

Anexo 2 Ficha de Levantamento de Dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de pênis é uma doença rara em países desenvolvidos, correspondendo a 0,4 a 0,6% de todas as neoplasias malignas. Já em países em desenvolvimento, o câncer de pênis continua sendo um importante problema de saúde (PARKIN et al. 1997), podendo, em alguns países da Ásia, África e América do Sul, chegar até a 20% das neoplasias no homem (ROTOLO e LYNCH 1991). Nos Estados Unidos são diagnosticados anualmente entre 750 a 1000 casos novos desta neoplasia, número que tem se mantido sem alterações nos últimos 50 anos (SCHELLHAMMER et al. 1992). No Brasil, dentre as neoplasias malignas do homem, o câncer de pênis corresponde a aproximadamente 2,1%, com 850 penectomias parciais ou totais por ano, sendo a incidência maior nas regiões Norte e Nordeste, onde as condições sócio-econômicas são piores (BRUMINI et al. 1982). O câncer de pênis, de modo geral, tem incidência aumentada a partir da sexta década de vida. Entretanto, no Brasil a maior incidência está entre a quarta e sétima década de vida, com dados mais recentes mostrando que quase dez por cento dos casos ocorrem em pacientes abaixo de 35 anos (FAVORITO et al. 2008). Diagnóstico em criança é raro, com poucos relatos na literatura (CUNHA et al. 1981; NARASIMHARAO et al. 1985).

A presença de fimose, más condições de higiene e baixo padrão sócio-econômico são os principais fatores de risco para desenvolvimento do câncer de

pênis (BRINTON et al. 1991). O acesso a água encanada representa um dado isolado de importância no que se refere às condições de higiene, diminuindo a incidência do câncer de pênis de 1,15 para 0,82 caso/100.000 hab., como foi demonstrado, por exemplo, na Dinamarca (FRISCH et al. 1995). Aspectos religiosos e culturais podem ser de suma importância para a incidência desta enfermidade. A realização de postectomia e a idade da realização da mesma influencia marcadamente em sua incidência (TSEN et al. 2001). Nos judeus postectomizados logo após o nascimento a incidência referida em alguns trabalhos é nula, enquanto os hindus não operados a incidência pode chegar à 3,1% (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; LOPES et al. 1993).

Nos maiores trabalhos publicados em relação à etnia, o “SEER database” e o estudo epidemiológico brasileiro, há maior incidência entre os caucasianos (BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007), (FAVORITO et al. 2008). Entretanto, esses trabalhos sugerem que não deva haver distinção entre a raça negra e branca, quando se compara nível sócio econômico semelhante, assim como um estudo tailandês (VATANASAPT et al. 1995).

1.2 ETIOLOGIA

A etiologia do câncer do pênis ainda não está bem definida. Alguns estudos sugerem que o esmegma (substância que é resultante da descamação das células epiteliais da face interna do prepúcio), que se acumula em homens com má higiene, principalmente com fimose, seria um agente carcinogênico, convertendo esteróis esmegmáticos em esteróis carcinogênicos pela *Micobacterium smegmatic* (SHABAD

1964; RAJU et al. 1985). Porém, testes experimentais sobre o papel do esmegma têm obtido resultados conflitantes (FISHMAN et al. 1942; DENNIS et al. 1956).

Infecção por alguns tipos de HPV tem sido associada na gênese do carcinoma peniano tanto nos estudos epidemiológicos (BRINTON et al. 1991), como em estudos de laboratório, onde segmentos do genoma viral puderam ser encontrados no DNA de célula do carcinoma peniano (ROSEMBERG et al. 1991). Técnicas avançadas de biologia molecular, como reações de cadeias de polimerase e hibridização in situ, forneceram evidências de um papel etiológico da infecção pelo papilomavirus humano na gênese do câncer de pênis, pela identificação de seqüências específicas de DNA de diferentes tipos de HPV em lesões penianas primárias (malignas ou benignas), mas não em pele normal (VARMA et al. 1991; IWASAWA et al. 1993).

O HPV afeta o epitélio escamoso da genitália masculina de maneira similar ao trato genital feminino, incluindo a formação de condilomas e a transformação neoplásica (SARKAR et al. 1992). A infecção ocorre por acesso direto das partículas virais às células basais através de pequenos traumas ou soluções de continuidade, principalmente por contato sexual (BROKER 1987).

Apesar de o vírus apresentar mais de 100 subtipos, dos casos associados à infecção pelo HPV, o tipo 16 é identificado em aproximadamente 80 a 90% dos casos, enquanto que o HPV 18 é encontrado em cerca de 10% (CUPP et al. 1995). Um estudo nacional, analisando 82 pacientes relataram a presença do DNA do HPV em 30,5% dos casos, sendo 52% do HPV tipo 16 e 16% do HPV 18. (BEZERRA et al. 2001a). O DNA do HPV tem sido encontrado tanto nos tumores primários como nas lesões metastáticas (BARRASSO et al. 1987; WIENER et al. 1992). Em estudos

recentes, 70 a 100% dos casos de neoplasia intraepitelial há DNA de HPV, que também está presente em praticamente metade dos carcinomas invasivos (DALING et al. 2005).

Apesar desses dados de positividade, não se pode atribuir que o vírus do HPV seja uma causa do carcinoma peniano, mas um fator associado importante e prevalente (WIENER et al. 1992). A infecção pelo HPV é considerada, em muitas regiões pobres, inclusive no Brasil, uma doença epidêmica.

Evidências epidemiológicas têm associado metabólitos do tabaco como fator etiológico (HELLBERG et al. 1987; MADEN et al. 1993; HARISH e RAVI 1995), concretizando ainda mais, a hipótese de que o fumo causa câncer em todo epitélio escamo-celular, independente do contato direto da droga com o tecido. Inclusive, há indícios que esse fator seja dose dependente (TSEN et al. 2001). Entretanto, esta relação é inconsistente, carecendo ainda de melhores estudos.

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

O paciente que apresenta câncer de pênis, de modo geral, por ser de um grupo de homens de baixo nível sócio-econômico, demora procurar assistência médica especializada, muitas vezes por vergonha ou medo, ou principalmente, por dificuldade de acesso ao serviço médico em cidades pobres e pequenas do interior do Brasil ou nos países subdesenvolvidos da Ásia, África e Américas do Sul e Central. Essa demora pode levar de 6-24 meses (BUDDINGTON et al. 1963; LOPES et al. 1994), prejudicando não só o tratamento, mas principalmente o prognóstico desse doente.

O tipo histológico mais freqüente é o carcinoma espinocelular, que incide entre 95 a 97% dos casos e caracteriza-se histologicamente por ceratinização, formação de pérola córnea e apresentação de vários graus de atividade mitótica (SCHELLHAMMER et al. 1992). O carcinoma basocelular, o adenocarcinoma, o melanoma e o sarcoma são tipos histológicos que raramente acomete o pênis (ASHLEY e EDWARDS 1957; DEHNER e SMITH 1970; FEGEN et al. 1970; JOHNSON et al. 1973; ANTONELLI et al. 1998; HERNANDEZ et al. 2008).

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde reviu a classificação dos carcinomas de pênis, incluindo diversas variantes de importância clínica, incluindo novos tipos histológicos como o carcinoma acantolítico, carcinoma epidermóide papilífero e carcinoma warty-basalóide (CUNHA et al. 2009; CHAUX et al. 2010a, CHAUX et al. 2010b; EBLE et al. 2004) (Anexo 1).

O carcinoma de pênis apresenta-se como tumor exofítico ou infiltrativo, na grande maioria dos casos. Geralmente relatado pelos pacientes como “ferida no pênis”, podendo vir como sinal isolado ou em associação com outros sintomas como: dor, inflamação, disúria, prurido e hemorragia. O câncer de pênis geralmente inicia-se na glândula estendendo-se para o prepúcio e corpo do pênis, podendo, se não tratado, invadir corpos esponjoso e cavernoso além da uretra (POMPEO et al. 2006). Mais comumente a lesão é encontrada na glândula (48% dos casos), seguido de prepúcio (21%), em ambas as áreas (em até 9%) e sulco coronal (6% dos casos) (SUFRIN e HUBEN 1987).

Quando não tratado nesta fase, evolui infiltrando tecidos adjacentes e dissemina por via linfática, apresentando metástases regionais, preferencialmente para os linfonodos inguinais e depois, para os ilíacos (NARAYANA et al. 1982;

PERSKY e DEKERNION 1986). Metástases por via hematogênica são raras, variando entre 1-10% (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978).

As metástases linfonodais quando não tratadas, invadem o feixe vâsculo-nervoso dos grandes vasos, levando os pacientes à morte num período de até 2 anos, por sepsis e/ou hemorragias vultuosas por ruptura vascular (BEGGS e SPRATT 1964; DERRICK et al. 1973). Não existem relatos de remissão espontânea.

1.4 DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO LINFONODAL

O diagnóstico definitivo é realizado a partir da biópsia da lesão peniana suspeita, buscando biopsiar a periferia da lesão, evitando áreas necro-hemorrágicas e quando possível, obtendo fragmentos do tecido normal. Pode ser incisional ou excisional naqueles tumores pequenos (LOPES et al. 1994). Não existem relatos de efeitos danosos como disseminação do tumor após biópsia da lesão (EKSTROM e EDSMYR 1958).

Atualmente, a propedêutica armada, com o uso da ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética não parece auxiliar no tumor primário (exceto em casos de obesidade mórbida), e permanece bastante questionada na detecção das metástases linfonodais e pélvicas por apresentar baixa sensibilidade e especificidade (HORENBLAS et al. 1991; BURGERS et al. 1992), sendo utilizado apenas na detecção de metástases a distância. (SCHELLHAMMER et al. 1992; VAPNEK et al. 1992). O uso de ressonância e ultrassom de alta resolução na avaliação de linfonodos inguinais, apresenta bons resultados (KAYES et al. 2007) A nova ressonância, com aceleração de nanopartículas linfotrópicas (LN-

MRI), e a tomografia computadorizada com emissão de pósitrons têm estudos com altos valores preditivos positivos e negativos (TABATABAEI et al. 2005; GRAAFLAND et al. 2009).

A punção por agulha fina dos linfonodos suspeitos pode ser realizada para avaliação loco-regional, entretanto apenas resultados positivos devem ser valorizados pela baixa sensibilidade do método (HORENBLAS et al. 1991; BURGERS et al. 1992; VAPNEK et al. 1992).

Na tentativa de aprimorar a biópsia de linfonodos inguinais, Cabanas, utilizando a linfocintilografia a partir do linfático principal no dorso peniano, realizou biópsia do linfonodo positivo pelo gama-probe, determinando o chamado linfonodo sentinela (LS), o primeiro sítio de disseminação da doença (CABANAS 1977). Segundo o próprio, esse procedimento definiria melhor o estadiamento e a conduta, já que a linfadenectomia radical seria evitada nos casos de LS negativo. No entanto, posteriormente, houve relatos em outros estudos, do desenvolvimento de metástases linfonodais em pacientes cujo LS foi negativo, e assim questionado o real valor do método (PERINETTI et al. 1980; WESPER et al. 1986).

Mais recentemente, HORENBLAS et al. (2000), utilizando a linfocintilografia pré-operatória com dextram marcado com tecnécio sob auxílio de um gama-probe no intra-operatório, rastreavam os possíveis sítios linfonodais de disseminação metastática, obtendo alto índice de acerto. Dois anos após, a partir da avaliação de 90 pacientes com câncer de pênis, utilizando o mesmo método de rastreamento, foi relatado um índice de falso negativo de 22%, com sensibilidade de 80%, deixando dúvidas sobre a eficiência do método (TANIS et al. 2002). Mais recentemente, dois novos estudos indicam novamente altas especificidade e sensibilidade, sendo

portanto, um possível avanço na triagem desses pacientes (LEIJTE et al. 2007, LEIJTE et al. 2009).

Nos dias atuais, a suspeição da presença de metástases linfonodais pode aumentar dependendo das características do estadiamento “T” ou do grau do tumor. Entretanto, local e tamanho do tumor primário, o subtipo patológico, presença de invasão perineural, e linfovascular, espessura e profundidade do tumor e tipo de invasão desse tumor, também tem se mostrado os fatores muito importantes (CUBILLA et al. 2008).

1.5 ESTADIAMENTO

O estadiamento de uma neoplasia consiste em avaliar a extensão da doença do ponto de vista local, regional e à distância. Representa um tempo fundamental para o prognóstico e definição da terapêutica a ser instituída.

Vários sistemas de estadiamento foram propostos para se estadiar o câncer do pênis.

O estadiamento mais utilizado foi o proposto por JACKSON (1966), que classificava a doença em 4 estádios clínicos:

I - Tumor limitado à glândula ou prepúcio.

II - Tumor invadindo o corpo peniano.

III - Tumor com metástases inguinais, porém ressecáveis.

IV - Tumor invadindo estruturas adjacentes e/ou tumor associado com metástases inguinais irressecáveis e/ou metástases à distância.

Esta classificação é basicamente clínica, não informando sobre características importantes do tumor primário e das metástases, como tamanho, extensão da infiltração da lesão primária, número e localização dos linfonodos comprometidos e grau de diferenciação do tumor (SCHELLHAMMER et al. 1992).

Outro sistema de classificação é o TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC), HARMER (1978), que leva em consideração o tamanho do tumor e/ou seu grau de infiltração em profundidade (T), a situação dos linfonodos inguinais (N) e a presença ou ausência de metástases (M). A avaliação dos linfonodos nesta classificação continua sendo clínica. Para tentar fornecer mais informações sobre a extensão da doença, a classificação TNM (HERMANEK e SOBIN 1987), incorporou parâmetros histopatológicos do tumor primário e dos linfonodos, como infiltração de corpo cavernoso, uretra, metástases em um ou mais linfonodos inguinais e metástases em linfonodos pélvicos.

Com menor frequência, fatores tais como tipo histológico, grau histológico e algumas características clínicas são adicionadas ao TNM para prover estádios clínicos. O fator mais importante em termos de prognóstico até o momento é a invasão angiolinfática, que deve fazer parte da classificação TNM para neoplasia de pênis em sua próxima revisão (SOBIN et al. 2009), (LOPES et al. 1996b), (LEIJTE et al. 2008). Entretanto, a literatura tem mostrado que a inclusão de biomarcadores pode subdividir as classes de tumores existentes nas classificações morfológicas existentes. Além disso, para o uso de novas drogas alvo-específico tais como imatinib, gefitinib e cetuximab, é necessário que o respectivo biomarcador esteja expresso ou mutado para a efetividade do tratamento. Portanto, a identificação de biomarcadores nos diversos tumores é um dos principais alvos de pesquisa hoje. Nos

últimos anos, o Hospital AC Camargo tem contribuído com vários estudos nesse segmento, com avaliação de p53, HPV, E-caderina, MMP-2, MMP-9, MIB-1, Ki-67, (LOPES et al. 2002; BEZERRA et al. 2001b; CAMPOS et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2007).

Quadro 1 - TNM - Estadiamento TNM.

ESTADIAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Tumor verrucoso não invasivo
T1	Tumor invade tecido conectivo subepitelial
T2	Tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso
T3	Tumor invade uretra ou próstata
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
ESTADIAMENTO DOS LINFONODOS REGIONAIS	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases única em linfonodo inguinal superficial
N2	Metástases múltiplas ou bilaterais em linfonodos inguinais superficiais
N3	Metástases em linfonodos inguinais profundos ou ilíacos
ESTADIAMENTO DAS METÁSTASES A DISTÂNCIA	
Mx	Metástases a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância

Fonte: SOBIN e WITTEKIND (2004)

1.6 ASPECTOS TERAPÊUTICOS

A principal forma de tratamento do câncer de pênis é a cirurgia, que se baseia na ressecção do tumor primário e linfadenectomia inguinal ou inguino-iliaca bilateral (CATALONA 1980; 1988; HORENBLAS et al. 1991; LOPES et al. 1996b).

Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico e o aperfeiçoamento de novas técnicas, cada vez menos invasivas, em prol do efeito cosmético, melhor qualidade de vida e reintegração biopsicossocial do paciente, preservando sempre, a eficiência do tratamento e a cura do tumor, as lesões pequenas, em estádios iniciais, podem ser tratadas de forma conservadora (LONT et al. 2006), seja por radioterapia, laserterapia (MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007), ou até ressecções regradas, com excisão local da lesão, respeitando com rigor as margens de segurança (MOHS et al. 1992). Há algumas restrições, como pacientes obesos, diabéticos, imunossuprimidos e em terapia anticoagulante, que têm tido piores resultados por dificuldade na realização do procedimento e/ou na cicatrização adequada do tratamento da lesão (TIETJEN e MALEK 1998).

Entretanto, necessitam de protocolos bem definidos e indicações criteriosas, além de um acompanhamento rigoroso no pós-operatório, pois os índices de recidiva sejam locais ou regionais são aumentados (ODLAND 1997; LONT et al. 2006). Com isso, o sucesso desses tratamentos só é possível com vigilância intensa, ao menos a cada 3 meses inicialmente, o que geralmente não é possível na maioria dos pacientes portadores de câncer de pênis, por motivos socioeconômicos (SHINDEL et al. 2007). Sendo assim, a orientação atual é para que não se faça retratamento com

técnicas menos invasivas após duas recidivas e que tumores maiores que “T2” devam ser tratados com amputação parcial ou total (MEIJER et al. 2007).

Apesar do impacto mutilante, as amputações parcial ou total do pênis são na prática clínica, as cirurgias mais realizadas no tratamento do carcinoma peniano, mesmo porque, na maioria dos casos o diagnóstico do tumor é feito tardiamente, já em estágio avançado. Amputações parciais devem apresentar margem entre 1,5 e 2,0 cm do tumor. Somente com margens adequadas, as taxas de recidivas locais são baixas (DEKERNION et al. 1973). Lesões que infiltrem a base do pênis ou em tumores extensos, com cotos penianos inadequados, geralmente menores que 4,0 cm, as amputações totais com uretostomia perineal são mais adequadas (DAS 1992).

A outra etapa fundamental na cura do câncer de pênis, é a abordagem terapêutica dos linfonodos regionais, com índice de cura pós linfadenectomia variando de 30-70%. Entretanto, quando não tratados, o óbito ocorre em geral dentro de dois anos (DEKERNION et al. 1973; CATALONA 1980; POMPEO 1993). A sobrevida do doente é inversamente proporcional ao número de linfonodos acometidos. Várias séries reportaram sobrevidas favoráveis em indivíduos com baixas taxas de acometimento linfonodal pós linfadenectomia (SRINIVAS et al. 1987; FRALEY et al. 1989; ORNELLAS et al. 1994). Apesar da baixa acurácia dos métodos outrora utilizados na avaliação linfonodal (SUFRIN e HUBEN 1987) e da alta morbidade da linfadenectomia (HERR 1992; LOPES et al. 1996b), a seleção dos pacientes deve ser criteriosa (BEGGS e SPRATT 1964; KAMAT et al. 1993; COBLENTZ e THEODORESCU 2002), pois é a última e única chance de cura do doente.

Muitos protocolos advogam o uso do antibiótico por 2-6 semanas pós tratamento do tumor primário do pênis, não só para um maior controle da infecção subjacente ao tumor, já que a linfadenopatia inflamatória é um diagnóstico diferencial importante, mas também, pela redução da morbidade perioperatória relacionada com a linfadenectomia inguinal posterior (ROTOLO e LYNCH 1991, SCHELLHAMMER et al. 1992).

Existe uma polêmica entre a realização de linfadenectomias terapêuticas ou profiláticas. Alguns estudos mostram que a realização das primeiras propicia uma sobrevida semelhante quando da realização das últimas (EKSTROM e EDSMYR 1958; BEGGS e SPRATT 1964); entretanto, estudos mais recentes não confirmam estes achados, mostrando índices de sobrevidas superiores quando realizadas profilaticamente em comparação com as terapêuticas, principalmente nos T2 e T3 (MCDOUGAL et al. 1986; FRALEY et al. 1989). Finalmente, a tendência atual é realizar linfadenectomias profiláticas nos tumores com estágio T2 e T3 e sem linfonomegalia palpável.

A forma de realização da linfadenectomia também é variável (CATALONA 1988). Atualmente, a cirurgia laparoscópica, que já é utilizada na dissecação linfática pélvica desde 1990 (SCHUESSLER et al. 1991), vem trazendo contribuições importantes não só na linfadenectomia pélvica, mas também na linfadenectomia inguinal nos pacientes com carcinoma de pênis. TOBIAS-MACHADO et al. (2007) apresentaram resultados iniciais favoráveis, como menor morbidade, menor permanência hospitalar, número de linfonodos ressecados satisfatórios, além de recuperação pós-operatória melhor e mais rápida. Contudo, ainda sem um seguimento adequado e, portanto, ainda longe de ser padrão-ouro na linfadenectomia

inguinal. A lateralidade da linfadenectomia é definida pela drenagem linfonodal do órgão, que é do tipo cruzada, assim, a linfadenectomia bilateral deve ser sempre o padrão, já que o risco de metástases contralaterais é de até 30% (SRINIVAS et al. 1987; LOPES et al. 1996b). Por outro lado, a linfadenectomia pélvica, só deve ser realizada quando da positividade dos linfonodos inguinais, pois a disseminação pélvica é encontrada apenas em 15 a 30% dos casos (PURAS et al. 1978; SRINIVAS et al. 1987). A disseminação linfática exclusiva para os linfonodos pélvicos é bastante rara (ABI-AAD e DEKERNION 1992).

1.7 FATORES PROGNÓSTICOS

A presença de metástases linfonodais é o principal fator de prognóstico no carcinoma de pênis, (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977), prevalecendo como consenso em vários estudos (NARAYANA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; POMPEO 1993; HORENBLAS et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996b).

Corroborando este consenso, SUFRIN e HUBEN (1987), obtiveram 27,5% e 66,2% de sobrevida em 5 anos, dos pacientes com e sem metástases linfonodais, respectivamente. SRINIVAS et al. (1987) apresentaram índices de 28% para aqueles com metástases e de 74% para os sem metástases, também em relação à sobrevida em 5 anos. Ao longo dos anos, inúmeros autores tentaram correlacionar fatores clínicos e/ou patológicos com comprometimento linfonodal pelo carcinoma peniano, buscando escores cada vez mais específicos, proporcionando uma seleção correta dos pacientes com melhor ou pior prognóstico e, a partir daí, uma abordagem eficaz com

o mínimo de morbi-mortalidade e o máximo de curabilidade da doença. Alguns autores correlacionaram a extensão do comprometimento linfonodal com o prognóstico, sugerindo até, algumas classificações como a que dividia o status linfonodal em N1- Apenas 1 linfonodo comprometido; N2- 2-6 linfonodos comprometidos; N3- >6 linfonodos, sendo N3a- Unilateral e N3b- Bilateral. N4- Comprometimento extra-nodal (SRINIVAS et al. 1987).

Neste mesmo estudo, foi relatada sobrevida em 5 anos de 50-80% nos casos de N1 e N2 e de 4-12% nos casos de N3 e N4. HORENBLAS et al. (1993), observaram que pacientes com mais de 2 linfonodos inguinais metastáticos, apresentavam não só maior incidência de metástases linfonodais contralaterais e pélvicas, como também maior índice de óbito pela doença. Estudos mais recentes, também obtiveram uma correlação diretamente proporcional do número de linfonodos com o aumento da taxa de óbito pela doença (LOPES et al. 2000).

Quando da correlação de fatores clínicos e histológicos do tumor primário com o prognóstico do carcinoma peniano, SOLSONA et al. (1992), correlacionando o sítio do tumor com o prognóstico da doença, observou que 64,3% dos pacientes com invasão de corpo cavernoso apresentaram metástases linfonodais, diferentemente daqueles sem invasão com apenas 4,2% de metástases. Posteriormente, a partir de uma análise prospectiva, o mesmo autor demonstrou que no estágio T1 havia 11% de comprometimento linfonodal contra 63% no estágio T2 e T3 (SOLSONA et al. 2001). LOPES et al. (1996b), avaliando espessura tumoral e presença de embolização vascular e linfática de células tumorais, observaram que tumores com profundidade maiores que 5mm, apresentavam um número maior de metástases linfonodais em comparação aos tumores mais superficiais, e que a

embolização tanto vascular quanto linfática é fator preditivo para metástase linfonodal, fato este, também observado por outros autores (FRALEY et al. 1989; SLATON et al. 2001; GUIMARÃES et al. 2006).

O grau de diferenciação do tumor é outro aspecto aventado por muitos autores como preditor, não somente de comprometimento linfonodal, mas também de sobrevida global (POMPEO 1993; SLATON et al. 2001). FRALEY et al. (1985), ratificaram esta afirmativa, quando observaram que pacientes com tumores pouco diferenciados, apresentam mais metástases linfonodais e menor sobrevida quando comparadas às lesões mais diferenciadas. SOLSONA et al. (2001), relatou risco de metástases linfonodais de 15% para os tumores de grau 1, 67% para o grau 2 e até, 75% para o grau 3. GUIMARÃES et al. (2006), avaliaram o tipo de invasão patológica do carcinoma epidermóide do pênis (baseada em padrões histológicos de tumores de outros órgãos em seres humanos), e procuraram correlacioná-la ao comprometimento linfonodal. Observaram uma significância estatística para o tipo infiltrativo (invasão em bloco, que infiltra amplamente o estroma do órgão) com 65% de metástase linfonodal em comparação ao tipo pushing (invasão em bloco com interface tumor hospedeiro bem delimitada) com apenas 23% de metástase nos linfonodos.

Atualmente, alguns autores estão desenvolvendo nomogramas buscando avaliar o prognóstico dos pacientes com neoplasia peniana. CHAUX et al. 2009 realizaram um índice prognóstico de presença de metástases linfonodais e de sobrevida, baseado em três variáveis: grau histológico, profundidade de invasão tumoral e infiltração perineural. As variáveis grau histológico e profundidade de invasão variam de 1 a 3, com a maior numeração para os tumores mais agressivos.

Quando da presença de infiltração perineural soma-se mais um ponto. A orientação desse índice é não realizar linfadenectomia em casos de soma 2 e 3, sempre realizar nos casos de soma 5 a 7 e avaliar individualmente os casos de soma 4. Em outro estudo, FICARRA et al. (2006), desenvolveram um nomograma baseado no estágio clínico dos linfonodos inguinais e nos achados patológicos dos tumores primários tratados que pudesse estimar o risco de desenvolvimento de metástases nos linfonodos e assim, tivesse o papel de selecionar com maior critério quais os pacientes que realmente se beneficiariam com a linfadenectomia radical em relação ao prognóstico e sobrevida, independente da morbi-mortalidade intrínseca do procedimento. Os fatores de maior risco para o desenvolvimento de metástase linfonodal foram em ordem decrescente: embolização vascular e/ou linfática; presença clínica de linfonomegalia; grau histológico do tumor; tipo de crescimento tumoral e infiltração de corpo esponjoso; invasão de corpo cavernoso; infiltração de uretra; espessura do tumor. Esses fatores somados dão o escore do paciente. Quanto maior a pontuação, maior o risco de metástases linfonodais. KATTAN et al. (2006), aperfeiçoando este nomograma, criou um segundo nomograma baseado desta vez, nos achados patológicos pós-amputação e pós-linfadenectomia. Observaram que a espessura tumoral, nesse novo nomograma representa um risco bem aumentado de desenvolvimento de metástases linfonodais quando comparado ao nomograma anterior. O risco na infiltração cavernosa suplantou o da infiltração esponjosa em relação também ao nomograma anterior, e o risco diminuiu entretanto, quando o fator analisado foi tipo de crescimento tumoral (vertical ou superficial). O HPV, infecção associada ao carcinoma de pênis, também muito estudado como fator correlacionado ao comprometimento linfonodal, não demonstrou influência

estatisticamente significativa, quando da presença isolada do DNA-HPV, em relação ao aumento da incidência de metástases linfonodais (VILLA e LOPES 1986; BEZERRA et al. 2001b). Por outro lado, a associação da presença do DNA-HPV com o aumento da expressão do p53 são relacionadas à um pior prognóstico da doença (LOPES et al. 2002).

Contudo, apesar de todos esses estudos tentarem correlacionar os fatores clínicos e/ou anátomo-patológicos, não existe ainda uma precisão incontestada no estadiamento do tumor. Com o aperfeiçoamento de técnicas de anatomia patológica e o desenvolvimento tecnológico, passou-se a se estudar fatores biomoleculares preditores de prognóstico, buscando assim, ampliar as ferramentas disponíveis para o melhor estadiamento e seleção de pacientes. LOPES et al. (2002), a partir de um estudo de 82 pacientes com carcinoma peniano, demonstraram que a hiperexpressão do p53 estava associada à uma alta incidência de metástases linfonodais tanto na análise univariada quanto na multivariada.

A partir do estudo da Prostaglandina E2 (PGE2) e Ciclooxigenase (COX) em carcinoma peniano, foi observada uma expressão aumentada de ambos biomarcadores, tanto através da imunoistoquímica, quanto pela técnica do “western blotting” somente em células tumorais, sem crescimento dos mesmos em tecido normal do pênis (GOLIJANIN et al. 2004). CAMPOS et al. (2006), avaliaram, através da técnica de imunoistoquímica, a caderina-E (E-caderina), a metaloproteinase 2 (MMP-2) e a metaloproteinase 9 (MMP-9) como fatores prognósticos no câncer peniano, relatando uma associação significativa da baixa expressão da caderina-E com metástases linfonodais. Em relação à recorrência da doença, a expressão da MMP-9 mostrou-se como fator independente de risco.

SOARES et al. (2006), confrontando os três tipos de crescimento e invasão do carcinoma peniano com a expressão imunoistoquímica das metaloproteinases dos tipos 2 e 9, obtiveram uma associação interessante entre a expressão aumentada das metaloproteinases 2 e 9 com um padrão de invasividade maior, principalmente naqueles tumores com pouca diferenciação histológica. GUIMARÃES et al. (2007) questionaram o valor prognóstico do PCNA e do MIB-1/KI-67 no CEC de pênis, demonstrando relação com a presença de linfonodos metastáticos, porém sem relação com a sobrevida.

1.8 TETRASPANINAS

As moléculas que sinalizam o meio extracelular têm essencial papel como indutoras da proliferação celular, migração, diferenciação e no desenvolvimento normal da morfogênese do tecido, podendo também participar do crescimento anormal das células associado com a neoplasia. Entre as moléculas envolvidas nesta atividade, temos as tetraspaninas.

As tetraspaninas são glicoproteínas com quatro domínios hidrofóbicos transmembrânicos (que atravessam a membrana celular quatro vezes), delimitando duas regiões extracitoplasmáticas de mesmo tamanho, apresentando o grupamento carboxila e amina na porção intracitoplasmática, e uma pequena volta extracelular (EC1) com 20 a 28 aminoácidos e uma grande volta (EC2) com 76 a 131 aminoácidos. (Figura 1) (Tabela 1) (BOUCHEIX et al. 2001). Compreendem atualmente 32 membros, entre eles CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 e CD82, sendo descobertas inicialmente, na superfície de leucócitos humanos. A função dessas

moléculas ainda não está determinada, mas estudos mostram a capacidade da formação de uma rede em conjunto com as integrinas e outras tetraspaninas. Estas moléculas se agregam, por exemplo, a $\beta 1$ integrinas, como $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ integrinas, modulando suas funções. A atividade de modulação dessas glicoproteínas depende de sua interação física com a molécula de integrina, sendo que em alguns tipos celulares, CD9 modula positivamente a resposta migratória dependente de integrinas. Evidências crescentes mostram que algumas integrinas e tetraspaninas distribuem-se em microdomínios especializados das membranas plasmáticas enriquecidos em glicosfingolípídeos e colesterol. Estes microdomínios (balsas lipídicas ou lipid rafts), devido a sua composição lipídica, favorecem a partição e organização de maquinarias protéicas associadas a transdução do sinal. O desafio é saber como essa rede das tetraspaninas modifica o comportamento das células e, com isso, saber como as doenças se relacionam com a mutação ou perda de cada tetraspanina (GOMES et al. 2005).

Essas moléculas são consideradas como supressoras de metástase em vários tumores sólidos, sendo a baixa expressão correlacionada com progressão dos tumores e com grande potencial metastático (SAITO et al. 2006).

Recentemente foi demonstrado que a tetraspanina CD82 está subregulada no carcinoma peniano e este fato se correlacionou com a ocorrência de metástases linfonodais, menor sobrevida global e a associação com o HPV (PROTZEL et al. 2008). Este estudo foi realizado com trinta casos de CEC de pênis e a expressão de CD82 estava diminuída ou ausente em 13 casos. O gene que codifica o CD82 está localizado no braço curto do cromossomo 11 e em nenhum caso foi observada perda de heterozigose nesta região, devendo ser o silenciamento decorrente de mecanismo

epigenético (PROTZEL et al. 2008). Este é o único estudo referente a tetraspaninas no câncer de pênis.

Em tumores de mama, foi encontrada uma relação inversa entre a expressão de CD9 e o estadió clínico dos doentes, além da forte relação com a presença de linfonodos axilares metastáticos (MIYAKE et al. 1995; HUANG et al. 1998). Em tumores de cólon, também foi encontrado relação entre queda da expressão de tetraspaninas e invasão hematogênica, metástases hepáticas e pior prognóstico. (MORI et al. 1998). Já em câncer de pulmão, foi percebida relação de pior prognóstico, independente do estádio tumoral, quando havia diminuição da expressão de tetraspaninas (HIGASHIYAMA et al. 1995). Por fim, estudos comparando a expressão de tetraspaninas e carcinoma escamoso de cavidade oral, demonstraram que a diminuição ou não expressão de CD9 nesses tumores estão correlacionados com aumento da incidência de metástases em linfonodos cervicais e prognóstico pior (BUIM et al. 2010; KUSUKAWA et al. 2001).

Apesar da busca por marcadores em câncer de pênis que possam demonstrar quais tumores são mais agressivos e de pior prognóstico, para que possamos selecionar quais são os pacientes candidatos à terapia mais radical, até o momento, nenhum estudo foi realizado a fim de caracterizar a expressão das tetraspaninas nesses tumores e a sua importância como marcador molecular.

O antígeno CD9 é uma proteína, que também é conhecida por MRP-1 (Motility-related protein), Tetraspanina 29 (Tspan-29), p24, Antígeno leucocitário MIC3, antígeno 5H9 e proteína inibidora de crescimento celular gene 2. Ela é composta por 228 aminoácidos, com 24kDa e está expressa em uma variedade de células hematopoiéticas e epiteliais. Descoberto inicialmente em linhagens de células

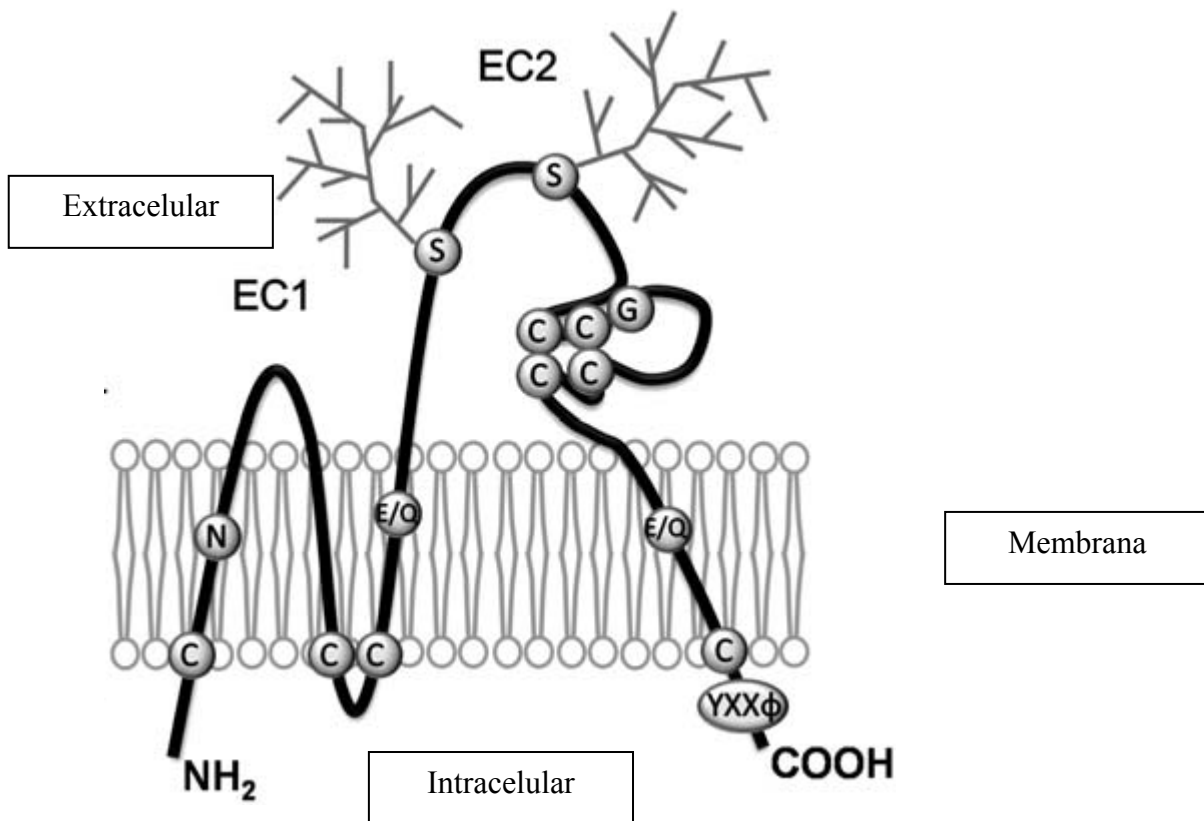
linfoblásticas do fenótipo pré-B, o CD9 foi posteriormente encontrado em plaquetas dentro de seus grânulos alfa, em monócitos, células pré-B, eosinófilos, basófilos e células T ativadas. (BOUCHEIX et al. 1991).

A proteína CD9 associada com outras proteínas de superfície, como $\alpha 6\beta 4$ integrina (molécula CD49f/CD104) e HLA-DR, possui papel na adesão, transdução de sinal e motilidade celular. Atualmente, outras funções são conhecidas como a agregação e ativação plaquetária, a fusão da célula ovo do espermatozóide, a regulação da formação da junção paranodal, além de aparente papel no desenvolvimento de metástases tumorais (LANZA et al. 1991; IKEYAMA et al. 1993; MASELLIS-SMITH et al. 1994; HIGGINBOTTOM et al. 2003).

1.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme exposto nessa introdução, o carcinoma peniano é uma doença devastadora física e psicologicamente, que ainda é bastante frequente em nosso país. Hoje conhecemos melhor sua história natural, seus tipos histológicos e diversos nomogramas prognósticos, porém, ainda o maior desafio é saber quais pacientes precisam da dissecação nodal, procedimento de alta morbidade. Neste sentido, o conhecimento da biologia tumoral é extremamente relevante.

Frente aos diversos trabalhos demonstrando a importância prognóstica da expressão da tetraspanina CD9 em tumores de sítios primários variados, e a ausência de estudos desta proteína em carcinomas penianos, este estudo visa analisar a distribuição da expressão de CD9 nas lesões que caracterizam o câncer de pênis, bem como o seu valor prognóstico.



Fonte: Adaptada de ZHANG et al. (2009)

Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura da tetraspanina. As tetraspaninas são compostas de 4 domínios transmembrana, um carboxi e amino terminal intracelular e 2 domínios extracelulares (um curto, EC1, e um longo, EC2). C, Cisteína; E, Ácido Glutâmico; G, Glicina; Q, Glutamina; N, Asparagina; S, Serina; Y, Tirosina; X, algum aminoácido; F, Aminoácido hidrofóbico.

Tabela 1 – Tabela demonstrando o tamanho e a genética das tetraspaninas humanas.

Molécula	Peso (kDa)	Comprimento a.a.	Gene #	Local.Cromossômica
CD9	24–26	228	Hs.1244	12p13
CD37	40–50	281	Hs.153053	19q13
CD53	32–40	219	Hs.82212	1p12-p31, 15q24
CD63 (ME491)	30 –60	237	Hs.76294	12q13
CD81 (TAPA-1)	26	236	Hs.54457	11p15.5
CD82 (R2/IA4)	50–80	267	Hs.25409	11p12
CD151 (PETA-3)	27	253	Hs.75564	11p15
C0-029	27–34	237	Hs.84072	12q14
NAG-2	28–35	238	Hs.26518	11
Oculospanin	unk	355	AAG42857*	unk
CD231/TM4SF-2				
/TALLA-1	38–45	244	Hs.82749	Xq11
SAS	unk	210	Hs.50984	12q13
Uroplakin Ib	28 (bov)	260	Hs.271580	3q13.3-q21
Uroplakin Ia	27 (bov)	258	Hs.159309	19q12 seq
Peripherin/RDS	39	345	Hs.281564	6p21
Rom-1	33	351	Hs.1943	11q12
Tspan-1	unk	241	Hs.38972	1p32
Tspan-2	25 (rat)	224	Hs.122540	1q12 seq
Tspan-3	unk	253	Hs.100090	unk
Tspan-5	unk	268	Hs.20709	4
Tspan-6	unk	245	Hs.121068	Xq21.1
NET-2	unk	305	Hs.16529	7q31
NET-5	unk	239	Hs.129826	12p13 seq
NET-6	unk	204	Hs.284243	7p21
NET-7	unk	294	Hs.95583	10q21
TM4-B	unk	245	Hs.271943	9q37

Fonte: Adaptado de BOUCHEIX et RUBINSTEIN (2001)

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- 1 Estudar a expressão imunoistoquímica de CD9 na progressão tumoral em CEC de pênis.
- 2 Correlacionar a imunoexpressão da tetraspanina CD9 com fatores clínicos, demográficos e anatomopatológicos selecionados.
- 3 Determinar o valor da expressão imunoistoquímica CD9 na frequência de metástase linfonodal e sobrevida dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos no estudo os pacientes admitidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de 1953 a 1997, com diagnóstico de carcinoma epidermóide do pênis. Foram selecionados os registros de 257 pacientes habilitados para o estudo.

Após avaliação dos prontuários médicos 187 pacientes permaneceram habilitados para análise e seleção de blocos de parafina e lâminas para confirmação diagnóstica, sendo que 67 pacientes permaneceram para a análise final.

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis, submetidos à amputação parcial ou total do pênis e a linfadenectomia regional, uni ou bilateral em qualquer momento do seu seguimento.

Para os pacientes não submetidos à linfadenectomia, foram considerados aqueles com seguimento mínimo de cinco anos.

Pacientes que possuíam material arquivado em parafina suficiente para novos cortes histológicos e confirmação do diagnóstico.

3.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes que não foram submetidos a linfadenectomias e/ou não tinham mínimo de cinco anos de seguimento.

Pacientes que apresentavam metástase à distância ao diagnóstico e que tinham sido submetidos a algum tipo de tratamento pélvico prévio ou tratamento adjuvante.

Pacientes com segundo tumor primário diagnosticado durante a evolução.

3.2 METODOLOGIA

Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários médicos arquivados no SAME - Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Centro de Tratamento e Pesquisa - Hospital do Câncer A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente de São Paulo.

Os dados coletados dos 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida (Anexo 2).

Foram estudados os respectivos materiais devidamente arquivados em parafina no Departamento de Anatomia Patológica Centro de Tratamento e Pesquisa-Hospital do Câncer A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente de São Paulo que foram passíveis de confirmação diagnóstica.

A partir do material existente nos blocos de parafina, realizaram-se cortes para posterior coloração imunoistoquímica do anticorpo CD9.

3.2.1 Diagnóstico

Todos os pacientes foram avaliados inicialmente por exame clínico geral, analisando-se os diversos aparelhos e sistemas, e exame locorregional, no qual a lesão primária era caracterizada segundo o seu aspecto, localização e extensão. A presença de linfonodos clinicamente metastáticos foi investigada através da palpação das regiões inguinais. O toque retal foi realizado para avaliação de possível infiltração da raiz do pênis e próstata.

A suspeita clínica foi confirmada sempre pela biópsia incisional de área periférica da lesão. O material de biópsia obtido foi fixado em formalina a 10% e incluído em parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina. Quando os pacientes já haviam sido biopsiados em outras instituições, as lâminas foram submetidas à revisão anatomopatológica sistemática.

3.2.2 Estadiamento

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema TNM. As metástases pulmonares foram investigadas através de radiografias de tórax realizadas nas incidências pósterio-anterior e perfil.

3.2.3 Procedimento cirúrgico

Todos os pacientes foram tratados por cirurgia. Os tumores foram excisados com margem macroscópica mínima de 2,0 cm. O tipo de cirurgia realizada variou de acordo com a extensão do tumor. Os procedimentos realizados foram: ressecção ampla, amputação parcial ou total do pênis. No último caso, os pacientes foram submetidos a uretroplastia perineal.

O tratamento dos linfonodos regionais, quando necessário, foi à linfadenectomia inguinal ou ilioinguinal bilateral. A linfadenectomia ilioinguinal consistiu na ressecção em monobloco de linfonodos, vasos linfáticos e tecido aureolar de sustentação da cadeia ilíaca comum, externa e interna, do conteúdo da fossa obturadora e da região inguinal, conforme técnica preconizada no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo (GENTIL et al. 1986).

Nas linfadenectomias inguinais, a cirurgia limitou-se a essa região, sendo ressecados os linfonodos superficiais e profundos.

3.2.4 Seguimento dos Pacientes

O acompanhamento dos pacientes se deu em consultas ambulatoriais. As consultas foram realizadas mensalmente no primeiro semestre, e bimestrais no segundo. Do segundo ao terceiro ano de seguimento estas consultas passaram a ser trimestrais, sendo após o terceiro ano, realizadas anualmente.

Em todas as consultas, era realizado exame físico sistemático locorregional.

As radiografias de tórax eram realizadas anualmente ou na vigência de sintomas.

Os pacientes foram classificados a partir do seguimento em:

- a) vivos sem câncer,
- b) mortos pelo câncer ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pósoperatório (até 30 dias pós-cirurgia),
- c) mortos por outras causas,
- d) perdidos no seguimento.

3.2.5 Exame anatomopatológico do tumor primário

Por se tratar de estudo retrospectivo, os protocolos de fixação e inclusão foram variáveis de acordo com a época. Os dados macroscópicos foram recuperados de laudos anatomopatológicos em arquivo. Todos os blocos foram recortados com secções novas e corados por HE.

Todas as lâminas foram revistas por três patologistas, Prof^o. Dr. Fernando Augusto Soares e Dra. Isabela Cunha do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo e pelo Dr. Antonio Cubilla, patologista paraguaio especialista em carcinoma peniano.

Os critérios usados para definir as variáveis anatomopatológicos foram:

- a) Espessura do tumor: Medida a partir da superfície até a infiltração da região mais profunda, com o auxílio de uma escala milimétrica, aplicada sobre o corte histológico. Foram então agrupados em 1) até 1 mm, 2) de 1-5 mm e 3) maior que 5 mm.

- b) Grau de diferenciação histológica:

Grau I (bem diferenciado): Caracterizado pela presença de células poligonais estratificadas, numerosas e visíveis pontes intercelulares, poucas mitoses, pequeno grau de anaplasia e evidente queratinização, com numerosas e visíveis pérolas córneas.

Grau II (moderadamente diferenciado): Caracterizado pela presença de células poligonais estratificadas, poucas pontes intercelulares, mitoses numerosas e atípicas, pleomorfismo nuclear evidente e pérolas córneas escassas ou ausentes.

Grau III (pouco diferenciado): Caracterizado pela raridade de células poligonais, com difícil visualização de pontes intercelulares. Predomínio de células pequenas, alongadas e indiferenciadas, acentuado pleomorfismo e hipercromasia nuclear, com mitoses numerosas e atípicas.

Os tumores com diferentes características histológicas foram classificados segundo o aspecto predominante, exceto os tumores pouco diferenciados, nos quais, quando havia mais de 10% da área indiferenciada, foram classificados como grau III.

- c) Embolização vascular linfática: Caracterizada por células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular de paredes delgadas, revestidas por células endoteliais desprovidas de fibras musculares lisas ou hemácias.
- d) Embolização vascular venosa: Caracterizada por células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular com hemácias, revestimento endotelial e fibras musculares.

Os grupos “c” e “d” foram agrupados em um único grupo, como embolização angiolinfática ou linfovascular.

- e) Infiltração de corpo esponjoso ou cavernoso: Caracterizado por invasão por células neoplásicas dessas estruturas vistas ao microscópio, parcial ou totalmente.

- f) Infiltração da Uretra: Caracterizada quando a neoplasia invade o epitélio e/ou o córion subjacente.
- g) Infiltração perineural: Caracterizada quando a neoplasia invade o espaço perineural.
- h) Tipo de invasão: (Padrão estabelecido segundo critérios modificados de ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989):
- Padrão tipo Deslocamento (pushing): Caracterizado quando as células tumorais invadem em grandes blocos celulares com interface tumor-hospedeiro bem delimitada.
 - Padrão tipo Infiltrante (infiltrativo): Caracterizado por invasão em blocos de cordões sólidos de células tumorais que infiltram amplamente o estroma do órgão.
- i) Tipo Histológico (morfologia): Foram utilizados os critérios previamente descritos e divididos como grupos de risco conforme previamente publicado por GUIMARÃES et al. (2009) e agrupados em baixo risco (Warty, warty invasivo, papilar, condiloma gigante, pseudoglandular, cuniculatum, verrucoso, verrucoso invasivo, pseudohiperplásico, e as formas mistas destas variantes) e alto risco (demais morfologias)

3.2.6 Técnica de Imunoistoquímica

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, identificaram-se as lâminas histológicas referentes à peça cirúrgica (tumor peniano). Em virtude de haver, em vários casos, mais de uma lâmina representativa do tumor primário, todas elas foram revistas por um único patologista (Prof^o. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo), selecionando-se aquela mais representativa da lesão.

Os blocos de parafina referentes a essas lâminas foram submetidos a novos cortes de 3 μ m e montados em lâminas previamente tratadas com 3 aminopropiltietoxi- silano (Sigma, A-3648, USA) e deixados por 24 horas em estufa a 60°C para melhor adesão dos tecidos nas mesmas.

Em seguida as lâminas obtidas foram submetidas à técnica imunoistoquímica para o anticorpo CD9. O anticorpo utilizado foi o CD9, clone 72F6, na titulação 1:60, (Neo Markers, Dr. Fremont CA/EUA). As lâminas foram processadas no BenchMark® XT Slide Staining System da Ventana Medical Systems (Arizona, EUA), seguindo a padronização do marcador CD9. Esse aparelho é utilizado para melhor técnica de diluição, recuperação antigênica, revelação e cromógeno do anticorpo. Todas as próximas etapas, até o término do processo, foram executadas pela máquina (desparafinação, reidratação, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, reação com anticorpo primário e secundário, e revelação).

As reações sempre foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para anticorpo CD9, e de dois controles negativos. Um dos controles negativos foi obtido pelo não uso do anticorpo primário durante os passos

da reação. O segundo controle negativo foi obtido pela supressão do anticorpo primário e substituição por imunoglobulina do mesmo idiótipo.

Na avaliação da reação imunoistoquímica foi empregado o aparelho Scanscope XT Scanner System (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA, EUA). A leitura da reação foi feita por um único observador. A avaliação foi qualitativa, considerando-se positivas as células que apresentavam membranas acastanhadas, com variação de tonalidade. Foi feito o ajuste do total de células positiva por percentual. A contagem foi realizada de forma automatizada por esse próprio aparelho, utilizando o algoritmo original Membrane I. Este algoritmo classifica a reação em 4 graus, sendo considerada positivas as marcações 3+, 2+ e 1+ , e como negativas aquelas indicadas como 0.

Nesta série, adotamos os valores abaixo de 35% de expressão como diminuída, entre 35% a 80% como semelhante ao normal e acima de 80% como aumentada, baseado nas amostras de tecidos penianos não neoplásicos (vide resultados), entre 36,10% e 82,93% (percentil 25% e 75%). Entretanto, após as análises estatísticas preliminares, pode-se notar que os resultados com expressão de CD9 abaixo de 35% e entre 35% e 80% foram bastante semelhantes. Sendo assim, obteve-se por considerar apenas o valor corte de 80%, dividindo a população em up regulation, valores acima de 80% de expressão, e normal like, abaixo de 80%.

3.3 CASUÍSTICA

3.3.1 Aspectos demográficos e clínicos.

A Tabela c apresenta as características clínico-demográficas da população estudada. A idade dos 67 pacientes variou de 29 e 80 anos com média de 52,94 e mediana de 50 (dp=12,19). Quarenta e nove pacientes (73,1%) apresentavam idade até 60 anos e 18 (26,9%) tinham mais de 60 anos. Cinquenta pacientes (74,6%) eram brancos e 17 (25,4%) não brancos.

Dos 67 pacientes, 45 (67,2%) eram casados e 8 (12%) não casados (solteiros, separados, viúvos) e em 14 (20,8%) não havia informação. Antecedentes de doença venérea foi referida em 35 pacientes (28%); Quatorze (20,9%) negavam antecedentes venéreos e não havia informação em 33 (49,3%) dos casos.

Apenas oito pacientes foram submetidos a postectomia, sendo em três (4,5%) a postectomia foi realizada em decorrência do tumor primário e em cinco casos (7,5%) esta foi realizada sem relação ao tumor primário. Cinquenta e seis pacientes (83,6%) não a realizaram. Em três (4,5%) não havia a informação.

Na apresentação à primeira consulta, 49 pacientes (73,1%) apresentavam o tumor do pênis intacto, enquanto 15 (22,4%) já tinham sido biopsiados previamente e três (4,5%) já haviam sido submetidos à amputação.

Todos os pacientes referiram como uma das queixas a ferida, sendo associado a dor, inflamação local, e prurido. Em 32 (47,8%) a ferida foi a única queixa.

O tempo de evolução da doença até o diagnóstico variou de 2 a 120 meses com média de 18,45 meses (dp=28,07) e mediana de 8 meses, sendo agrupados para análise, em até 6 meses e mais de 6 meses de evolução.

Tabela 2 - Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

	Variável	Nº de Pacientes	%
Idade	< 60 anos	49	73,1
	>60 anos	18	26,9
Estado civil	Casados	45	67,2
	Não Casados	08	12,0
	Sem Informação	14	20,8
Raça	Branca	50	74,6
	Não Branca	17	25,4
Tempo evolução	< 6 meses	29	45,3
	> 6 meses	34	50,2
	Ignorado	03	4,5
Antec. Venéreo	Não	14	20,9
	Sim	20	29,9
	Sem informação	33	49,3
Estadiamento cT*	T1	03	4,5
	T2	34	50,7
	T3	26	38,8
	T4	04	6,0
Estadiamento cN*	N0	30	44,8
	N1	13	19,4
	N2	18	26,9
	N3	04	6,0
	Sem informação	02	3,0
Situação 1ª consulta	Biopsiado	15	22,4
	Intacto	49	73,1
	Amputado	03	4,5

*Estadiamento TNM

De acordo com o estadiamento clínico “T” SOBIN e WITTEKIND (2004), três (4,5%) apresentavam tumores T1, 34 (50,7%) T2, 26 (38,8%) T3, 4 (6,0%) T4. Em relação ao estágio linfonodal, o número de casos N0, N1, N2, N3 e Nx foi respectivamente, 30 (44,8%); 13 (19,4%); 18 (26,9%); 4 (6,0%) e 2 (3,0%). Nenhum paciente apresentava metástase a distância. (Tabela 3). (Figuras 2-3)

Tabela 3 - Número e porcentagem de pacientes segundo estadiamento clínico T e N dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Estádio clínico T / N	N0 n (%)	N1 n (%)	N2 n (%)	N3 n (%)	Sem informação n (%)	Total n (%)
T1	2 (3,0)	1 (1,5)	0	0	0	3 (4,5)
T2	19 (28,3)	5 (7,5)	10 (14,9)	0	0	34 (29,6)
T3	7 (10,4)	7 (10,4)	6 (9,0)	4 (6,0)	2 (3,0)	26 (38,8)
T4	2 (3,0)	0	2 (3,0)	0	0	4 (6,0)
TOTAL	30 (44,7)	13 (19,4)	18 (26,9)	4 (6,0)	2 (3,0)	67 (100,0)

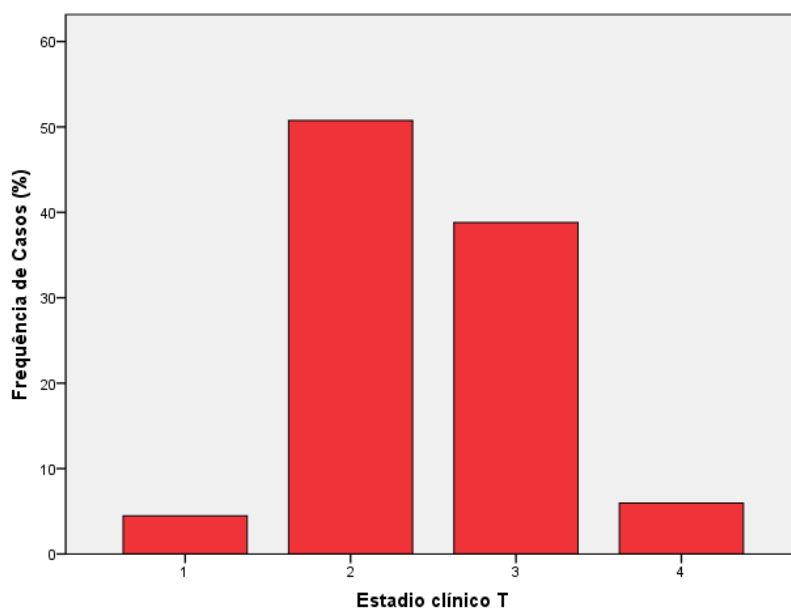


Figura 2 - Caracterização do estadiamento clínico T dos 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis.

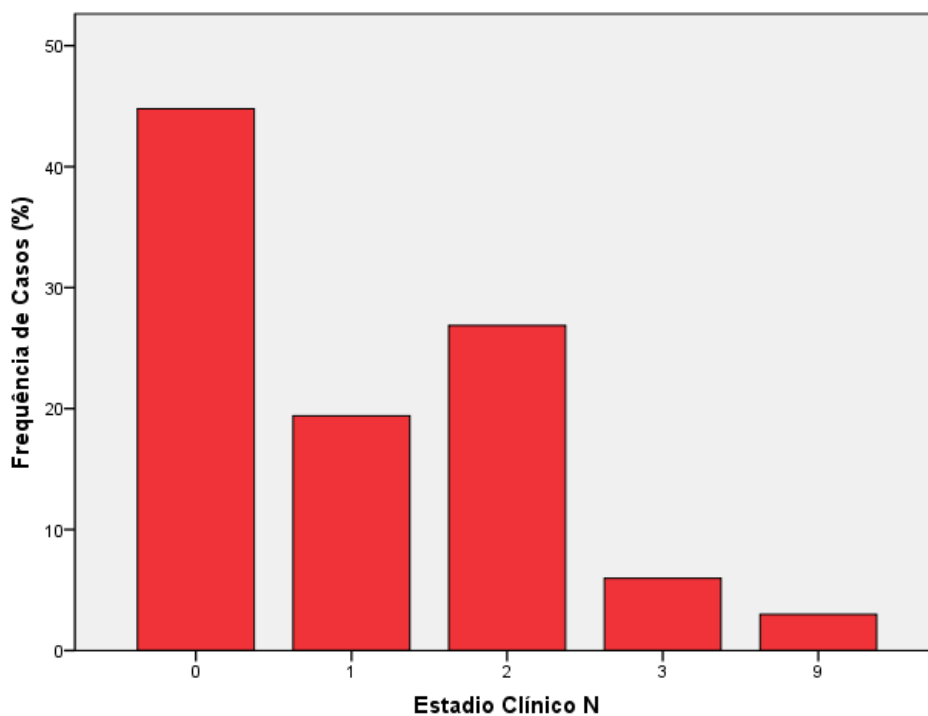


Figura 3 - Caracterização do estadiamento clínico N dos 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis.

3.3.2 Aspectos cirúrgicos

Vinte e oito (41,8%) pacientes foram submetidos à amputação parcial do pênis e 33 (49,3%) à amputação total. Em 6 casos foi realizada a emasculação (9,0%).

Em 14 (20,9%) pacientes foi realizado esvaziamento ínguino-crural e em 18 (26,9%), esvaziamento ínguino-ilíaco. Em 35 (52,2%) não se realizou esvaziamento inguinal, mas esse grupo de pacientes apresenta seguimento maior que 5 anos. (Tabela 4)

Tabela 4 - Tipo de esvaziamento linfonodal realizado como terapêutica nos 32 pacientes portadores de câncer de pênis.

Tipo do Esvaziamento	N	%
Linfadenectomia inguino-crural	14	20,9
Linfadenectomia inguino-iliaco	18	26,9
Sem linfadenectomia	35	52,2
Total	67	100

Entre esses 32 pacientes, foram dissecados no total 914 linfonodos com média de 13,64 por paciente (dp= 18,62), variando de 8 a 87. Em 15 (22,4%) não foram encontradas metástases linfonodais à linfadenectomia, em 17 (25,4%) os linfonodos apresentavam acometimento neoplásico e em 35 (52,2%) não foi realizada linfadenectomia. Houve um total de 70 linfonodos metastáticos, com variação de 1 a 18 por paciente com média de 2,19 (dp= 4.07).

Considerando os 16 pacientes em que havia informação sobre a lateralidade dos linfonodos metastáticos, observou-se que oito (50%) apresentavam metástases unilaterais e oito (50%) bilaterais.

Quinze pacientes apresentavam informações sobre a topografia dos linfonodos metastáticos, sendo 14 (20,9%) inguinal e um (1,5%) ilíaco isoladamente. Em dois (3%) pacientes não havia informação e em 50 (74,6%) os linfonodos dissecados eram negativos para neoplasia ou não foi realizada linfadenectomia.

Complicações pós-operatórias relacionadas às amputações ocorreram em 15 (22,4%) pacientes, sendo a estenose uretral a mais freqüente, com 12 casos (17,9%).

Dos 32 pacientes submetidos à linfadenectomia, houve ao menos uma complicação pós-operatória em 30 (93,7%) casos, sendo a mais freqüente a

associação de infecção, necrose e deiscência dos retalhos dermogordurosos, presentes em 10 (31,2%) pacientes. Houve 2 (6,6%) casos de ruptura de vasos femurais e 12 (37,5%) pacientes evoluíram com linfedema de membros inferiores, geralmente associados à infecção e deiscência dos retalhos de pele.

O tempo de seguimento variou de 0,3 a 321,6 meses com média de 115,71 (dp=98,95) e mediana de 90,03 meses. Em 14 pacientes (20,9%) houve recorrência tumoral. Em 11 casos (16,4%) locoregional e em 3 (4,5%) à distância. Ao final do seguimento, 29 (43,3%) pacientes estavam vivos sem doença, 1 (1,5%) vivo com câncer, 11 (16,4%) morreram em decorrência do câncer ou de complicação do tratamento, 23 (34,3%) faleceram por outras causas e 3 (4,5%) foram perdidos de seguimento (Tabela 5). Todos estavam livres de doença ao momento da última informação.

Tabela 5 - Situação clínica dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.

Situação Clínica	N	%
Vivos sem doença	29	43,3
Vivos com doença	01	1,5
Óbito por câncer / complicação do tratamento (inclui óbito até 30 dias da cirurgia)	11	16,4
Óbito por outra causa	23	34,3
Perdidos de seguimento	3	4,5

3.3.3 Aspectos anatomopatológicos

O grau de diferenciação foi assim representado: 15 pacientes (22,4%) apresentavam tumor grau I; 20 pacientes (29,9%), tumor grau II e 32 (47,8%), tumor grau III.

Dos 67 casos estudados, 19 casos (28,4%) apresentavam espessura tumoral de até 5 mm, enquanto 45 casos (67,1%) apresentavam espessura maior do que 5 mm. Somente em três casos (4,5%) não foram obtidas informações.

A invasão linfovascular foi constatada em 23 casos (34,3%) e estava ausente em 43 casos (64,2%).

Foi observada a infiltração dos corpos cavernosos em 36 casos (53,7%) e a sua ausência em 11 casos (16,4%). Os casos sem informação totalizaram 20 (29,9%). A invasão do corpo esponjoso esteve presente em 53 casos (79,1%), enquanto a sua ausência foi identificada em quatro casos (6%), sendo 10 casos (14,9%) sem informação. A invasão uretral estava presente em 24 casos (35,8%) e ausente em 18 casos (26,9%), sendo 25 casos (37,3%) sem informação.

A coilocitose foi outro aspecto estudado, presente em 13 casos (19,4%). Sua ausência foi constatada em 18 casos (26,9%), com 36 casos (53,7%) sem informação.

A Tabela 6 apresenta as características anatomopatológicas do tumor primário nos 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.

Tabela 6 - Frequência de variáveis anatomopatológicas do tumor primário dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

	Variável	Nº de Pacientes	%
Grau de diferenciação	I	15	22,4
	II	20	29,9
	III	32	47,7
Espessura do tumor	< 5 mm	19	28,4
	> 5 mm	45	67,1
	Indeterminada	03	4,5
Permeação vascular-linfática	Ausente	43	64,2
	Presente	23	34,3
	Indeterminada	01	1,5
Infiltração Peri-neural	Ausente	41	61,2
	Presente	25	37,3
	Indeterminada	01	1,5
Infiltração corpo esponjoso	Ausente	04	6,0
	Presente	53	79,1
	Indeterminada	10	14,9
Infiltração de corpos cavernosos	Ausente	11	16,4
	Presente	36	53,7
	Indeterminada	20	29,9
Infiltração de uretra	Ausente	18	26,9
	Presente	24	35,8
	Indeterminada	25	37,3
Coilocitose	Ausente	18	26,9
	Presente	13	19,4
	Indeterminada	36	53,7
Invasão Órgãos Adjacentes	Ausente	64	95,5
	Presente	00	0,0
	Indeterminada	03	4,5
Tipo Histológico	Baixo Risco	09	13,4
	Alto Risco	58	86,6

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram registrados em uma ficha de levantamento padronizada (Anexo 2), digitados e arquivados em um banco de dados com o auxílio do programa “Excel 7.0 for Windows”. Para a análise estatística utilizou-se o software for Windows Statistical Package for Social Science (SPSS), versão 16.0.

A distribuição das variáveis clínicas, anatomopatológicas e referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingências.

A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e seus respectivos desvios padrões. As associações das variáveis qualitativas com expressão de CD9 e presença de metástase linfonodal foram efetuadas com o teste do qui-quadrado bi-caudal; sempre que necessário, devido às frequências esperadas inferiores ao valor 5 dentro de uma tabela maior que 2x2, utilizou-se o valor do qui-quadrado bi-caudal corrigido. (Teste de Fisher).

A identificação dos fatores independentes relacionadas com a metástase linfonodal foi realizada pela regressão logística múltipla. As variáveis selecionadas para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20.

As sobrevidas global e livre de doença foram feitas pelo estimador produto de limite de KAPLAN e MEIER (1958) e a comparação entre curvas através do teste de Log-rank. Na análise multivariada para sobrevida usou-se o modelo de riscos proporcionais de COX (1972) calculando-se as razões de risco proporcional para óbito.

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida livre de doença e sobrevida global, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20.

O tempo de sobrevida global foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data da ultima informação objetiva observada (para os pacientes vivos nesta data) ou a data do óbito decorrente de qualquer motivo. Os pacientes vivos na data da ultima informação foram considerados sob censura para a curva de sobrevida pelo método de KAPLAN e MEIER (1958) ou para utilização da regressão de COX (1972).

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

O resultado final para os modelos multivariados, regressão logística e de COX (1972), foi obtido pela estratégia stepwise forward selection, onde a partir da variável de mais significância na análise univariada foram acrescentadas às outras, uma a uma, em ordem crescente.

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas com eliminação de casas decimais. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0.05$.

Com a identificação das variáveis de importância para o risco de metástase linfonodal através da análise multivariada foi estabelecido grupos de risco associando-se estas variáveis.

3.5 ANÁLISE DE RISCO E ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de estudo retrospectivo, não houve a participação direta de pacientes, nem a introdução de qualquer modificação terapêutica, ou aplicação de qualquer medicação ou método que tenha gerado danos, benefícios, ou outras consequências a qualquer paciente.

Desta forma, não foi necessária a adoção de consentimento pós-informado. Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer. O uso do material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois, a terapêutica julgada necessária para os mesmos já havia sido instituída e sempre se deixou material residual no bloco.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital do Câncer e foi aprovado em 20/01/2009. Está protocolado na referida comissão sob o número 1129/08.

4 RESULTADOS

4.1 REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS CD9

4.1.1 Análise Univariada

Utilizando o valor de corte em 80% (como explicado na metodologia), foram comparados os valores de expressão de CD9 com as variáveis clínico-demográficas, não se encontrando nenhuma relação estatisticamente significativa, como pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7 – Expressão de CD9 segundo variáveis clínicas e demográficas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Expressão CD9 < 80% n (%)	Expressão CD9 >80% n (%)	p(x ²)
Idade	Até 60 anos	32 (65,3)	17 (34,7)	0,329
	Mais que 60 anos	14 (77,8)	4 (22,2)	
Raça	Branca	33 (66,0)	17 (34,0)	0,421
	Não Branca	13 (76,5)	4 (23,5)	
Tempo de evolução*	Até 6 meses	18 (62,1)	11 (37,9)	0,427
	Mais que 6 meses	25 (71,4)	10 (28,6)	
Antecedentes venérios*	Não	6 (42,9)	8 (57,1)	0,113 **
	Sim	14 (70,0)	6 (30,0)	
Postectomia*	Não	39 (69,6)	17 (30,4)	0,465
	Sim	3 (60,0)	2 (40,0)	
Estadiamento cT*	T1-T2	28 (75,7)	9 (24,3)	0,169 **
	T3-T4	18 (60,0)	12 (40,0)	
Estadiamento cN*	N negativo	21 (70,0)	9 (30,0)	0,713
	N positivo	23 (65,7)	12 (34,3)	
Recidiva	Não	39 (73,6)	14 (26,4)	0,112 **
	Sim	7 (50,0)	7 (50,0)	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Dentre as variáveis anatomopatológicas as seguintes associaram-se direta e significativamente com a expressão de CD9 na análise univariada: a invasão perineural ($p=0,028$) e a embolização angiolinfática ($p=0,002$), como demonstrado na Tabela 8

Tabela 8 – Expressão de CD9 segundo variáveis anatomopatológicas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Expressão CD9	Expressão CD9	p(x ²)
		<80% n (%)	> 80% n (%)	
Diferenciação	Grau I	11 (73,3)	4 (26,7)	0,760
	Grau II-III	35 (67,3)	17 (32,7)	
Espessura tumoral	< 5mm	14 (73,7)	5 (26,3)	0,577
	>5mm	32 (66,7)	16 (33,3)	
Embolização angiolímfática *	Não	35 (81,4)	8 (18,6)	0,002 **
	Sim	10 (43,5)	13 (61,9)	
Infiltração peri-neural *	Não	32 (78,0)	9 (22,0)	0,028**
	Sim	13 (52,0)	12 (48,0)	
Infiltração de corpo cavernoso*	Não	8 (72,7)	3 (27,3)	0,485
	Sim	20 (55,6)	16 (44,4)	
Infiltração de corpo esponjoso*	Não	2 (50,0)	2 (50,0)	0,594
	Sim	36 (67,9)	17 (32,1)	
Infiltração de uretra*	Não	13 (72,2)	5 (27,8)	0,147 **
	Sim	12 (50,0)	12 (50,0)	
Coilocitose*	Ausente	10 (55,6)	8 (44,4)	0,440
	Presente	9 (69,2)	4 (30,8)	
Tipo de invasão*	Regular	8 (57,1)	6 (42,9)	0,349
	Irregular	34 (70,8)	14 (29,2)	
Tipo Histológico	Baixo risco	5 (55,6)	4 (44,4)	0,446
	Alto risco	41 (89,1)	17 (29,3)	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

4.1.2 Análise multivariada

A lista das variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 são listadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p(x²)
Embolização angiolinfática	0,002
Infiltração Peri-neural	0,028
Recidiva	0,112
Antecedente venéreo	0,113
Infiltração de uretra	0,147
Estadiamento cT	0,169

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas apenas a embolização angiolinfática (RR = 5,687; IC 95% [1,843 – 17,550]), foi fator independente de risco para expressão aumentada de CD9. (Tabela 10).

Tabela 10 - Variáveis independentes relacionadas com aumento da expressão de CD9 em 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variáveis	Categoria	RR	IC 95%
Embolização	Negativo	1	Ref.
angiolinfática	Positivo	5,687	1,843 – 17,550

4.1.3 Avaliação da expressão de cd9 na progressão tumoral

Foram analisados as expressões de CD9 em áreas amostrais diferentes da mesma lâmina, quando presente na mesma amostra, sendo divididos 5 regiões: uretra normal, tecido peniano normal (distante da área de neoplasia), hiperplasia celular (sem evidencia tumoral), carcinoma in situ e carcinoma invasivo. Dentre essas lâminas de carcinoma, havia presença de uretra em 17 casos, tecido normal em 16, hiperplásico em 35 e carcinoma in situ em 15.

Observou-se na uretra e no carcinoma in situ praticamente a expressão total de CD9 (média de 98,06 e 95,65, respectivamente). Em seguida, o tecido

hiperplásico, com expressão média de 82,78, seguido do tecido normal (76,53) e de carcinoma (66,30). Tabela 11

Tabela 11 - Expressão de CD9 em casos de CEC de Pênis.

	Uretra	Tecido Normal	Hiperplasia	CA in situ	Tumor
Nº de casos	17	16	35	15	77
CD9 (Mediana)	99,48	65,65	85,23	98,02	63,72
CD9 (Média)	98,06	63,18	75,06	95,65	59,03

Analisando a diferença entre esses casos, podemos observar que há uma presença crescente de CD9 na medida em que há progressão do tecido normal até a o carcinoma in situ, e uma variação estatisticamente significativa quando comparamos o tecido normal com o carcinoma in situ ($p < 0,05$).

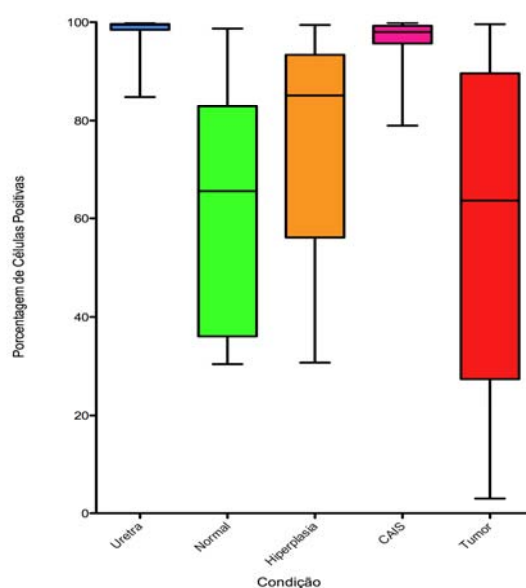


Figura 4 - Gráfico demonstrando a expressão de CD9 (em %) em uretra, tecido peniano normal, tecido peniano hiperplasiado, carcinoma in situ peniano e tumor peniano invasivo.

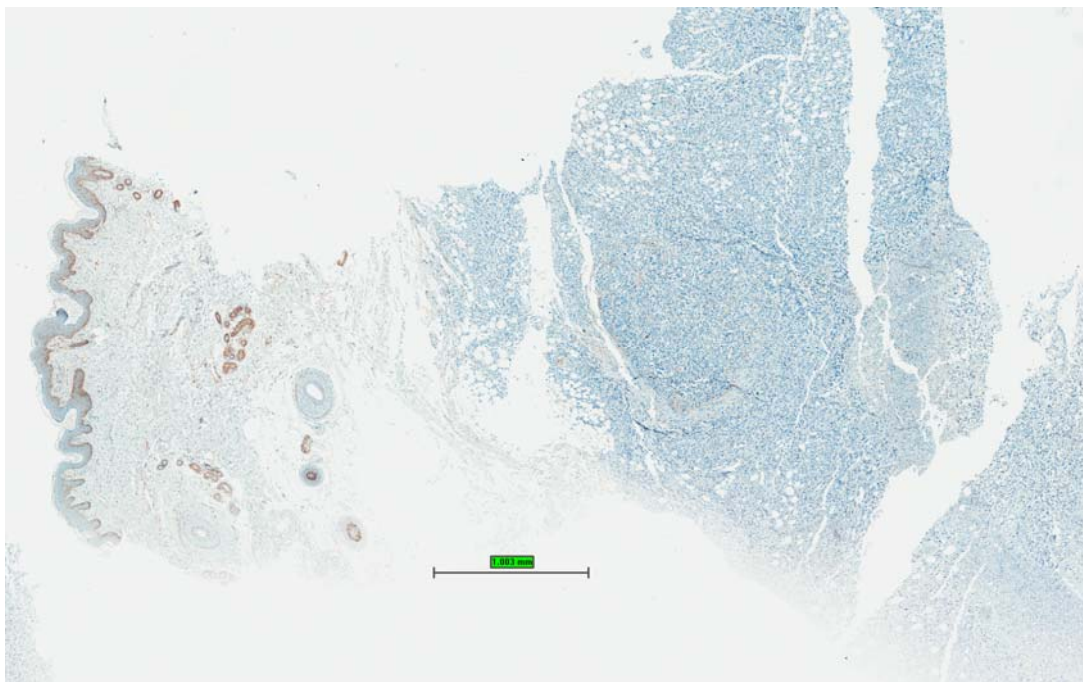


Figura 5 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para o CD9.

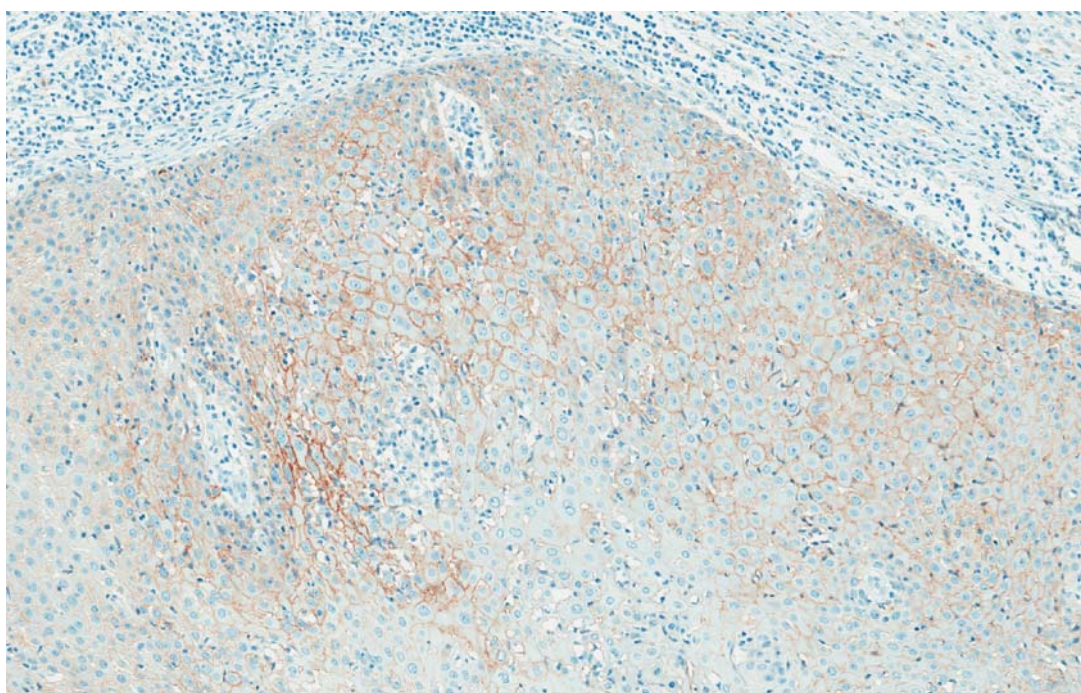


Figura 6 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva para o CD9 (aumento original 200x)

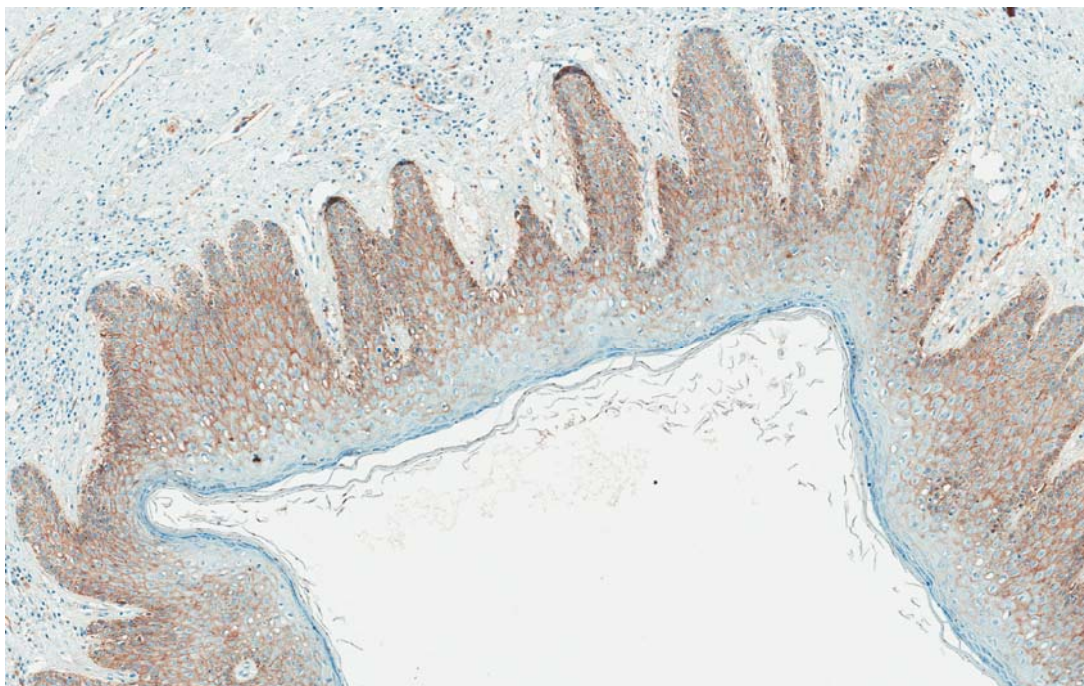


Figura 7 - Fotomicrografia de carcinoma in situ do pênis com marcação positiva para CD9 (aumento original 20x)

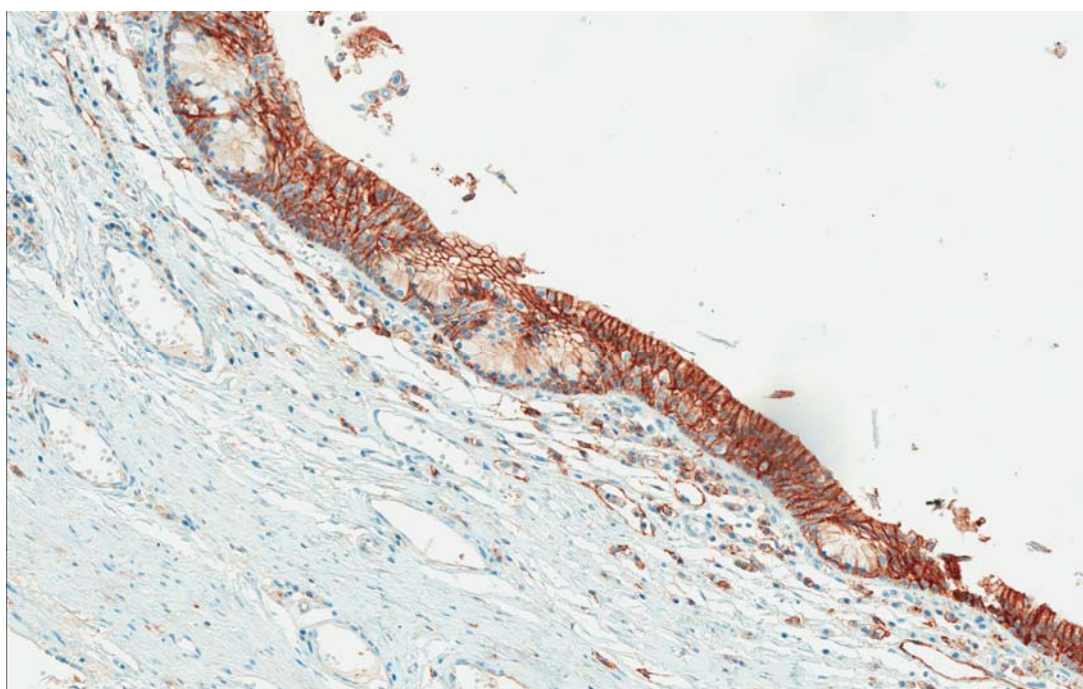


Figura 8 - Fotomicrografia de uretra com marcação positiva para CD9 (aumento original 200x)

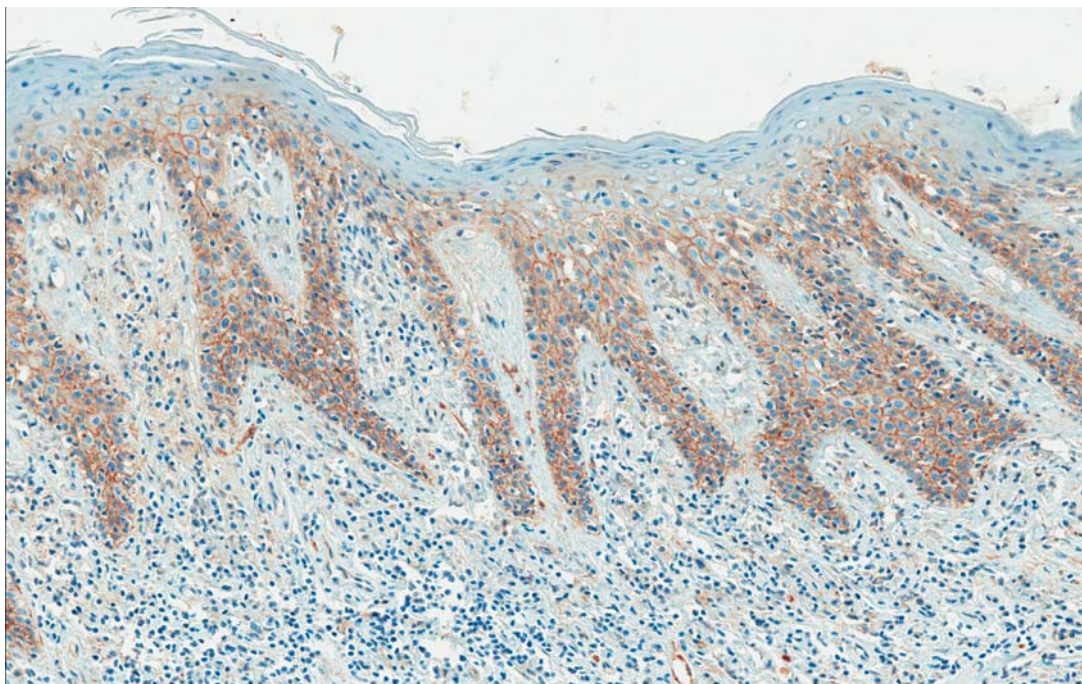


Figura 9 - Fotomicrografia de hiperplasia com marcação positiva para CD9 (aumento original 200x)

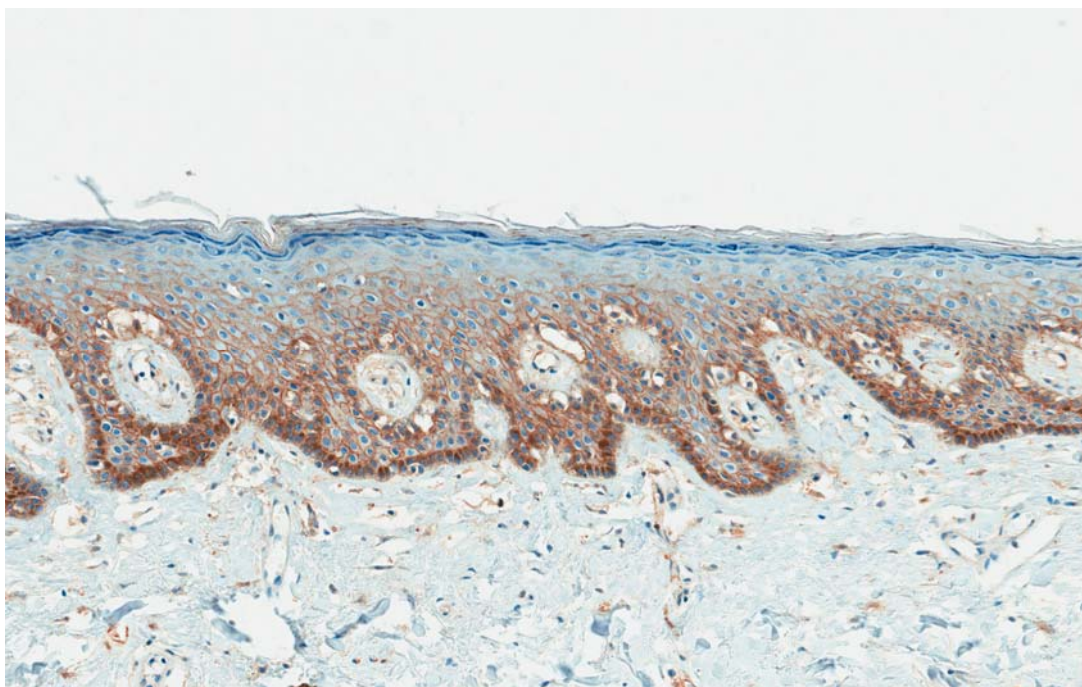


Figura 10 - Fotomicrografia de mucosa peniana com leve displasia com marcação positiva para CD9 (aumento original 200x)

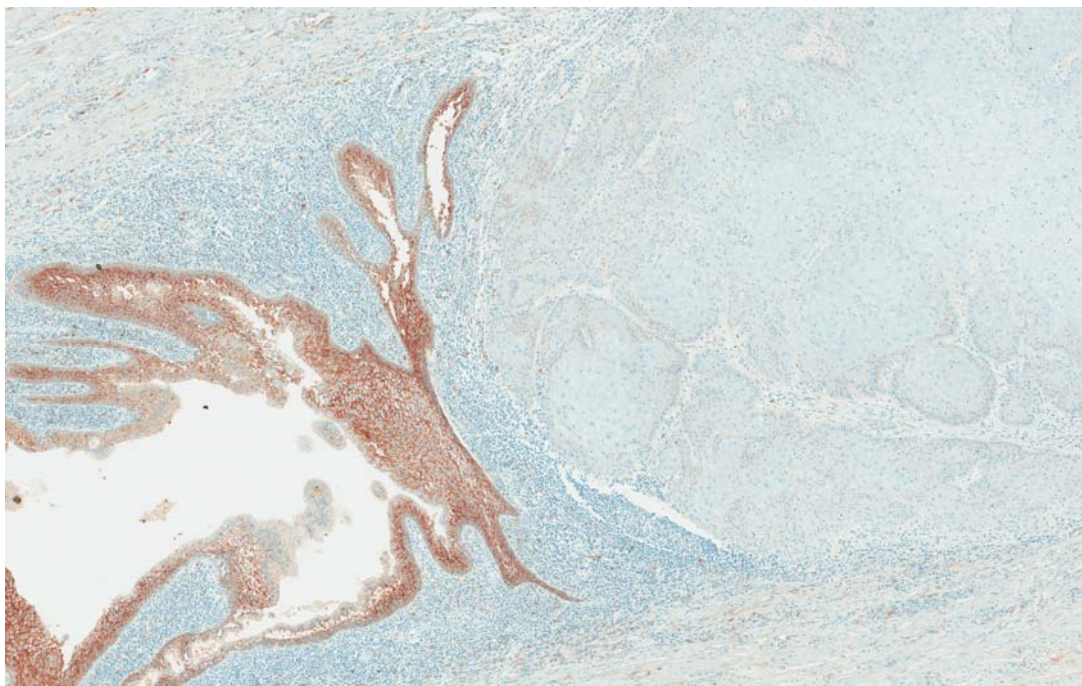


Figura 11 - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa e uretra normal com marcação positiva pelo CD9 (aumento original 2x)

4.2 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASES LINFONODAIS

4.2.1 Análise univariada

Dentre as variáveis clínico-demográficas avaliadas, as que se associaram com a presença de metástase linfonodal na análise univariada foi o estadiamento clínico N ($p=0,001$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Linfonodo negativo	Linfonodo positivo	p(x ²)
		n (%)	n (%)	
Idade	Até 60 anos	35 (71,4)	14 (28,6)	0,527
	Mais que 60 anos	15 (83,3)	3 (16,7)	
Raça	Branca	36 (72,0)	14 (28,0)	0,527
	Não Branca	14 (82,4)	3 (17,6)	
Tempo de evolução	Até 6 meses	21 (72,4)	8 (27,6)	0,476
	Mais que 6 meses	28 (80,0)	7 (20,0)	
Antecedentes venéreos*	Não	11 (78,6)	3 (21,4)	0,809
	Sim	15 (75,0)	5 (25,0)	
Postectomia*	Não	40 (71,4)	16 (28,6)	0,185 **
	Sim	8 (100,0)	0 (0,0)	
Estadiamento Ct*	T1-T2	29(78,4)	8 (21,6)	0,433
	T3-T4	21 (70,0)	9 (30,0)	
Estadiamento cN*	N negativo	28 (93,3)	2 (6,7)	0,001 **
	N positivo	20 (57,1)	15 (42,9)	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

Dentre as variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas as seguintes associaram-se significativamente com a presença de metástases linfonodais na análise univariada: a invasão peri-neural ($p < 0,001$) e a diferenciação do tumor primário ($p = 0,008$). A associação entre expressão de CD9 e metástase nos linfonodos não foi significativa ($p = 0,842$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Status linfonodal segundo variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímica dos 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Linfonodo negativo n (%)	Linfonodo positivo n (%)	p(x ²)
Diferenciação	Grau I	15 (100,0)	0 (0,0)	0,008 **
	Grau II-III	35 (67,3)	17 (32,7)	
Espessura tumoral	Até 5mm	14 (73,7)	5 (26,3)	0,570
	>5mm	36 (75,0)	12 (25,0)	
Permeação vascular-linfática *	Não	35 (81,4)	8 (18,6)	0,069 **
	Sim	14 (60,9)	9 (39,1)	
Infiltração peri-neural *	Não	37 (90,2)	4 (9,8)	<0,001 **
	Sim	12 (48,0)	13 (52,0)	
Infiltração de corpo cavernoso*	Não	9(81,8)	2 (18,2)	0,461
	Sim	23 (63,9)	13 (36,1)	
Infiltração de corpo esponjoso*	Não	2 (50,0)	2 (50,0)	0,220
	Sim	42 (79,2)	11 (20,8)	
Infiltração de uretra*	Não	13 (72,2)	5 (27,8)	1,0
	Sim	18 (75,0)	6 (25,0)	
Coilocitose*	Ausente	11 (61,1)	7 (38,9)	0,409
	Presente	6 (46,2)	7 (53,8)	
Tipo de invasão*	Regular	10 (71,4)	4 (28,6)	0,717
	Irregular	38 (79,2)	10 (20,8)	
Tipo Histológico	Baixo risco	7 (77,8)	2 (22,2)	0,590
	Alto risco	43 (74,1)	15 (25,9)	
CD9*	Negativo (< 80 %)	34 (73,9%)	12 (26,1%)	0,842
	Positivo (> 80 %)	16 (74,6%)	5 (23,8%)	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão logística.

4.2.2 Análise multivariada

A lista das variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 são listadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p(x ²)
Infiltração Peri-neural	<0,001
Estádio cN	0,001
Grau de Diferenciação	0,008
Permeação linfo-vascular	0,069
Postectomia	0,185

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, Infiltração perineural (RR = 8,802; IC 95% [2,168 – 35,737]) e estágio clínico N (RR = 9,318; IC 95% [1,716 – 50,607]), foram fatores independentes de risco para o comprometimento metastático dos linfonodos (Tabela 15).

Tabela 15 - Variáveis independentes relacionadas com a presença de metástase linfonodal em 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variáveis	Categoria	RR	IC 95%
Infiltração Peri-neural	Negativo	1	Ref.
	Positivo	8,802	2,168 – 35,737
Estádio cN	Positivo	1	Ref.
	Negativo	9,318	1,716 – 50,607

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.3.1 Sobrevida câncer específica

- Análise univariada

A taxa de sobrevida câncer específica em 10 anos da população estudada foi de 83,6%, como mostrado na Figura 12.

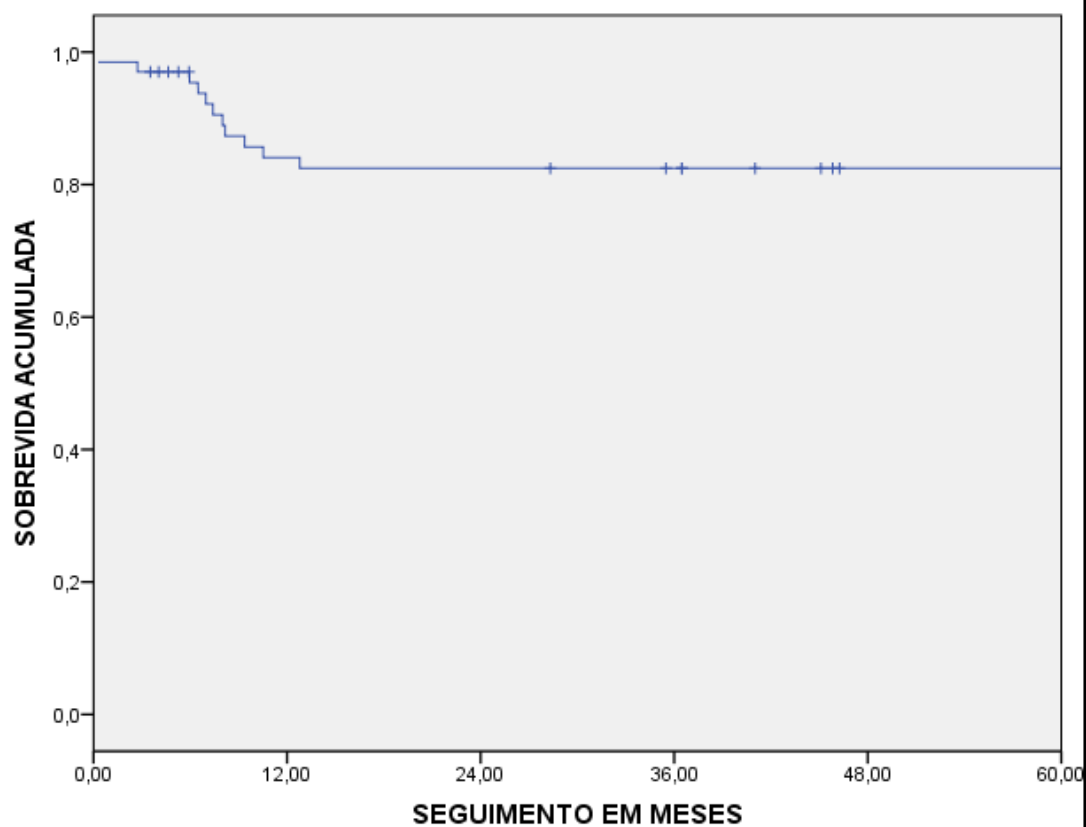


Figura 12 - Curva de sobrevida câncer específica para os 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica foi o estadiamento clínico T ($p=0,001$) e o estadiamento clínico N ($p=0,028$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida câncer específica 10 anos (%)	p(log rank)
Idade	Até 60 anos	49	79,6	0,174**
	> 60 anos	18	94,4	
Raça	Branca	50	82,0	0,621
	Não Branca	17	88,2	
Tempo de evolução*	Até 6 meses	29	82,8	0,799
	> 6 meses	35	84,4	
Estadiamento cT	T1-T2	37	97,3	0,001**
	T3-T4	30	66,7	
Estadiamento cN*	N negativo	30	93,3	0,028**
	N positivo	35	74,3	
Postectomia*	Não	56	80,4	0,197**
	Sim	8	100,0	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para a regressão de COX.

Dentre as variáveis anatomopatológicas e que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica estão: metástase linfonodal ($p<0,001$), grau de diferenciação histológica ($p=0,049$), permeação linfo-vascular ($p=0,003$), infiltração perineural ($p<0,001$) e infiltração de corpo cavernoso ($p=0,047$). A expressão de CD9 não influenciou significativamente a sobrevida câncer específica (Tabela 17), embora tenha mostrado tendência à significância.

Tabela 17 - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 10 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas e imunoexpressão de CD9 em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N	Sobrevida câncer específica 10 anos (%)	P(log rank)
Diferenciação	Grau I	15	100,0	0,049**
	Grau II-III	52	78,8	
Espessura tumoral	Até 5mm	19	94,7	0,152**
	>5mm	48	79,2	
Permeação linfo-vascular*	Não	43	93,0	0,003**
	Sim	23	65,2	
Infiltração perineural*	Não	41	95,1	<0,001**
	Sim	25	64,0	
Infiltração de corpo cavernoso*	Não	11	100,0	0,047**
	Sim	36	72,2	
Infiltração de corpo esponjoso*	Não	4	100,0	0,149**
	Sim	53	83,0	
Infiltração de uretra*	Não	18	94,4	0,050**
	Sim	24	70,8	
Coilocitose*	Ausente	18	72,2	0,397
	Presente	13	84,6	
Tipo de invasão*	Regular	14	78,6	0,686
	Irregular	48	85,4	
Tipo Histológico	Baixo risco	9	88,9	0,576
	Alto risco	58	82,8	
Metástase linfonodal	Não	50	94,0	< 0,001 **
	Sim	17	52,9	
Expressão CD9	<80%	46	89,1	0,084 **
	>80%	21	71,4	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão de COX.

- Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida câncer específica, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 18).

Tabela 18 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	P
Infiltração perineural	<0,001
Metástase linfonodal	< 0,001
Estádio clínico T	0,001
Permeação linfo-vascular	0,003
Estádio clínico N	0,028
Infiltração de corpo cavernoso	0,047
Grau de diferenciação	0,049
Infiltração da uretra	0,050
CD9 80%	0,084
Espessura tumoral	0,152
Idade	0,174
Postectomia	0,197

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, infiltração perineural (RR = 4,775; IC 95% [0,878 – 25,977]) e metástase linfonodal (RR = 5,640; IC 95% [1,292 – 24,629]) foram fatores independentes de risco para a sobrevida câncer específica (Tabela 19).

Tabela 19 – Modelo multivariado para a sobrevida câncer específica em pacientes portadores de carcinoma peniano em 67 pacientes. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Infiltração perineural	Não	1	Ref.
	Sim	4,775	0,878 – 25,977
Metástase linfonodal	Não	1	Ref.
	Sim	5,640	1,292 – 24,629

4.3.2 Sobrevida Global

- Análise univariada

A taxa de sobrevida Global em 10 anos da população estudada foi de 49,3%, como mostrado na Figura 13.

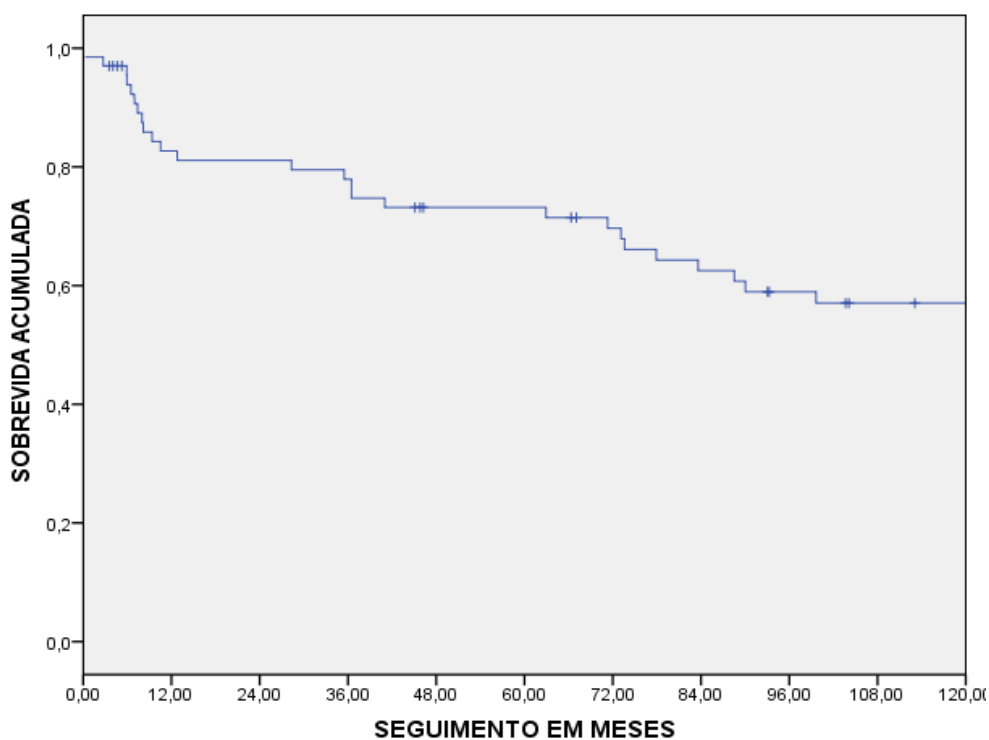


Figura 13 - Curva de sobrevida Global para os 67 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas nenhuma influenciou significativamente a sobrevida global (Tabela 20).

Tabela 20 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com variáveis clínicas em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida Global em 5 anos (%)	p(log rank)
Idade	Até 60 anos	49	49,0	0,521
	> 60 anos	18	50,0	
Raça	Branca	50	44,0	0,365
	Não Branca	17	64,7	
Tempo de evolução *	Até 6 meses	29	51,7	0,684
	> 6 meses	35	51,4	
Postectomia *	Não	56	44,6	0,069 **
	Sim	8	75,0	
Estadiamento cT	T1-T2	37	59,5	0,095 **
	T3-T4	30	36,7	
Estadiamento cN *	N negativo	30	50,0	0,454
	N positivo	35	51,4	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para a regressão de COX.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida Global estão: infiltração peri-neural ($p<0,001$), grau de diferenciação histológica ($p=0,002$), invasão linfo-vascular ($p=0,047$), infiltração de corpo cavernoso ($p=0,023$), infiltração de uretra ($p=0,021$) presença de metástase linfonodal ($p<0,001$). A imunoexpressão de CD9 não influenciou essa sobrevida ($p=0,099$) (Tabela 21), embora de forma similar com a sobrevida câncer específica, haja uma tendência estatística.

Tabela 21 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	N	Sobrevida Global em 5 anos (%)	p(log rank)
Diferenciação	Grau I	15	80,0	0,002 **
	Grau II-III	52	40,4	
Espessura tumoral	Até 5mm	19	63,2	0,093 **
	>5mm	48	43,8	
Permeação linfo-vascular*	Não	43	55,8	0,047 **
	Sim	23	39,1	
Infiltração perineural*	Não	41	61,0	<0,001 **
	Sim	25	32,0	
Infiltração de corpo * cavernoso	Não	11	72,7	0,023 **
	Sim	36	41,7	
Infiltração de corpo * esponjoso	Não	4	75,0	0,478
	Sim	53	47,2	
Infiltração de uretra*	Não	18	72,2	0,021 **
	Sim	24	37,5	
Coilocitose*	Ausente	18	27,8	0,975
	Presente	13	38,5	
Tipo de invasão*	Regular	14	42,9	0,849
	Irregular	48	54,2	
Tipo Histológico	Baixo risco	9	77,8	0,065 **
	Alto risco	58	44,8	
Metástase linfonodal*	Sim	50	56,0	< 0,001 **
	Não	17	29,4	
Expressão CD9	< 80%	46	54,3	0,099
	> 80%	21	38,1	

*Excluídos os casos sem informação.

** Variáveis selecionadas para regressão de COX.

- Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para Sobrevida Global, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 22).

Tabela 22 - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	P
Infiltração perineural	<0,001
Metástase linfonodal	<0,001
Grau de diferenciação	0,002
Infiltração da Uretra	0,021
Infiltração de corpo cavernoso	0,023
Permeação linfo-vascular	0,047
Tipo Histológico	0,065
Postectomia	0,069
Espessura tumoral	0,093
Estadio clinico T	0,095
CD9 80%	0,099

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, Infiltração perineural (RR= 2,634; IC 95% [1,227 – 5,653]), e Metástase linfonodal (RR = 2,600 IC 95% [1,165 – 5,802]), foram fatores independentes para risco de óbito (Tabela 23).

Tabela 23 - Risco de óbito em 67 pacientes portadores de carcinoma peniano. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	RR	IC 95%
Infiltração perineural	Não	1	Ref
	Sim	2,634	1,227 – 5,653
Metástase linfonodal	Não	1	Ref
	Sim	2,600	1,165 – 5,802

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS GERAIS

A neoplasia de pênis é uma doença mais prevalente nos países em desenvolvimento, provavelmente pelas piores condições sócio-econômicas e de higiene, além da ausência de medidas preventivas. Nessas localidades ainda temos dificuldade de diagnóstico precoce e com isso, dificuldade no tratamento adequado da doença. Temos então, que a maioria dos estudos com grandes incidências, que possibilitam a identificação de fatores de risco para a ocorrência de metástases, são originários desses países (KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996b).

Geralmente os pacientes apresentam câncer de pênis entre 40 e 70 anos. Nesta série, a média de idade foi de 52,94 (dp=12,19), sendo que 73% dos pacientes apresentavam-se com menos de 60 anos, e a mediana foi de 50 anos. Estudos brasileiros mostram média entre 55 e 60 anos, enquanto os de países desenvolvidos a média se eleva, chegando próximo de 70 anos (HORENBLAS e VAN TINTERE 1994; ORNELLAS et al. 1994; HERNANDEZ et al. 2008; FAVORITO et al. 2009). A presença de doentes mais jovens no Brasil talvez se deva às diferenças de condições de vida, menor número de postectomias, que se tem demonstrado um fator protetor, além das diferenças geográficas. Corroborando com essas más condições de assistência médica, tivemos nessa amostra mais de 50% dos pacientes com demora

superior a 6 meses após o início dos sintomas para conseguir iniciar tratamento médico (média de 18,45 meses).

Em relação à apresentação clínica da doença na primeira consulta ao especialista, foi observado, nesta série, que 73,1% dos pacientes apresentavam o tumor primário intacto, enquanto apenas 4,5% dos mesmos chegaram ao consultório do especialista já amputado. A biópsia do tumor foi realizada em 22,4% dos casos. Os dados mais uma vez, corroboram a dificuldade do diagnóstico e tratamento adequados em países como o Brasil.

Existe um consenso de que o carcinoma de pênis deva ser diagnosticado e tratado precocemente. Sabe-se que o tratamento de escolha é o cirúrgico, variando a extensão da cirurgia de acordo com o tamanho e a invasão do tumor. É notório que a linfadenectomia, quando indicada, representa a única forma de cura do tumor, determinando um bom prognóstico para o doente, já que a presença de metástase linfonodal representa o principal fator de prognóstico do carcinoma peniano (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977; NARAYANA et al. 1982; SUFRIN e HUBEN 1987; YOUNG et al. 1991; KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996a). SUFRIN e HUBEN (1987) estudaram a sobrevida de várias séries e encontraram sobrevida global de 51,6%; considerando-se pacientes com linfonodos metastáticos e não metastáticos, a sobrevida a 5 anos foi de 27,5 e 66,2% respectivamente. Da mesma forma HORENBLAS e VAN TITEREN (1994), mostraram índices de sobrevida de 50 e 93% em 5 anos para pacientes com e sem metástases linfonodais, enquanto SRINIVAS et al. (1987) apresentaram índices de 28 e 74% respectivamente. Na nossa série, a sobrevida câncer específica em 10 anos

para pacientes com e sem metástase linfonodal foi de 52,9 e 94,0% e a sobrevida global em 10 anos foi de 29,4 e 56,0%.

Com isso, diversos estudos vêm tentando, ao longo dos anos, identificar fatores de risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais no carcinoma de pênis (ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996b). HALL et al. (1998), estudando espessura tumoral, observaram que aqueles tumores com mais de 5mm de espessura, apresentavam uma incidência aumentada de metástases linfonodais, assim como LOPES et al. (1996b) e CAMPOS et al. (2006), que mostraram significância em tumores de até 5mm como mais associados à metástases em linfonodos. A casuística obtida neste estudo, não apresentou significância estatística para a espessura tumoral como preditor de metástases linfonodais ($p=0,570$). Entretanto, como era de se esperar, o estadiamento N clínico apresentou significância nesse quesito, em amostra univariada ($p=0,001$) e multivariada ($RR = 9,318$; IC 95% [2,2 – 35,7]). Já a diferenciação entre os estadiamentos T, não demonstraram diferença na previsão de metástase linfonodal ($p=0.433$).

Analisando invasão linfática e vascular pelo tumor, estudos mostram que essas variáveis são preditoras de metástases linfonodais, tanto na análise univariada, quanto na multivariada (FRALEY et al. 1989; LOPES et al. 1996b; SLATON et al. 2001). LOPES et al. (1996b), além de concluírem que a presença desses êmbolos tumorais são indicadores significativos de risco para metástases linfonodais tanto na análise univariada, quanto na multivariada, atribuíram um risco de disseminação da doença para linfonodos inguinais de 63,5% para pacientes com êmbolos tumorais e de 30,6% para aqueles sem sinais patológicos de embolização tumoral. Inclusive, a próxima classificação TNM já deve incluir essa característica, dividindo o

estadiamento T1 em “a” e “b”, na ausência e presença dessa embolização. Nossa população apresentou melhor prognóstico nos pacientes sem essa característica, entretanto não apresentou a invasão vascular com significância na análise univariada ($p=0,069$), como fatores prognósticos no desenvolvimento de metástase linfonodais. Já a infiltração perineural se mostrou preditora de metástases linfonodais, em análises uni e multi variadas, ($p<0,001$ e $RR= 8,802$ IC 95% [1,716 – 50,607] respectivamente), assim como na literatura (CHAUX et al. 2009).

Em relação ao grau de diferenciação histológica do tumor, estudos têm demonstrado que quanto menos diferenciado é o tumor, mais metástases linfonodais ele apresenta e consequentemente, pior sobrevida quando comparados àqueles bem diferenciados (SRINIVAS et al. 1987; SOLSONA et al. 1992; HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994; ORNELLAS et al. 1994; SLATON et al. 2001). Demonstra-se nesse estudo, uma significância estatística na análise univariada ($p=0,008$) do grau de diferenciação tumoral como preditor de metástases linfonodais. SOLSONA et al. (2001) mostraram que o risco de metástases linfonodais para tumores de baixo grau ou bem diferenciados foi superior em 15 vezes, enquanto para os tumores de alto grau ou indiferenciados foi superior em 75 vezes.

A correlação entre o local de invasão tumoral e a metástase linfonodal vem sendo mostrado na literatura ao longo dos anos (HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994; PIZZOCARO et al. 1997; VILLAVICENCIO et al. 1997; SLATON et al. 2001). Nessa série, invasão dos corpos cavernosos, corpos esponjosos e invasão uretral, não demonstraram ser preditores de risco para metástase linfonodal com $p=0,46$, $p=0,22$ e $p=1,0$, respectivamente na análise univariada. Num outro trabalho, FICARRA et al. (2005), mostraram significância estatística da invasão uretral

($p<0,01$) e também da invasão do corpo esponjoso ($p<0,01$) como fortes preditores no envolvimento linfonodal no carcinoma peniano.

Em relação aos aspectos cirúrgicos no manejo do paciente portador de carcinoma peniano, nossa casuística apresentou 41,8% de amputação parcial e 49,3% de amputação total, com apenas 9,0% de ressecção local, no que se refere ao tratamento do tumor primário. Provavelmente isso ocorreu pela presença de doença mais avançada (estádios clínicos T3 e T4) (44,8%). Esses dados coincidem com a maioria dos trabalhos na literatura (FRALEY et al. 1989; LOPES et al. 1996b; FICARRA et al. 2006), nos quais as amputações são opções iniciais, e muitas vezes únicas de tratamento do tumor primário. Por outro lado, vale ressaltar, a importância de técnicas conservadoras, atualmente, cada vez mais realizadas (OZSAHIN et al. 2006; KAYES et al. 2007; MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007), e cujas vantagens são a preservação funcional e estética do membro, sem menosprezar o princípio fundamental da cirurgia oncológica que é o da segurança e o da curabilidade da doença. É importante lembrar, contudo, que nos pacientes tratados com técnicas conservadoras, o seguimento do mesmo, deve ser cuidadoso e bem protocolado, evitando os altos índices de recidiva seja ela local e/ou regional existentes (LONT et al. 2006). Nessa série a recorrência locoregional ocorreu em 11 casos (16,4%) e à distância em um caso (1,5%). Em outros dois casos (3,0%), houve recorrência tanto locoregional como à distância.

A técnica clássica da linfadenectomia não é isenta de complicações (ORNELLAS et al. 1991), podendo chegar a 70% (LOPES 1995). Na literatura o índice médio de complicações relatadas está em torno de 60% (SKINNER et al. 1972; KAMAT et al. 1993). As séries contemporâneas apresentam índices menores

de complicações, em torno de 50%, a partir de adequados cuidados técnicos durante a cirurgia e no pós-operatório (BEVAN-THOMAS et al. 2002; NELSON et al. 2004). Nessa série, dos 32 pacientes (47,8%) submetidos à linfadenectomia, 30 pacientes (93,7%) apresentaram complicações isoladas ou associadas. Destas, as mais frequentes foram as complicações de menor intensidade, como a infecção associado ou não deiscência de pele (20,5%), seguido de linfedema isolado ou não (18,0%). Esse grande número de complicações, provavelmente se deve a contabilidade de casos mais antigos, além de seguimento rigoroso desses pacientes.

Atualmente há uma subdivisão entre os casos de câncer de pênis, com diversos tipos histológicos, já previamente descritos e divididos em grupos de risco, que foram adotados nessa série (GUIMARÃES et al. 2009). Não houve diferença estatística quando avaliado na previsão de metástase linfonodal ($p=0,590$), sobrevida câncer específica ($p=0,576$) e sobrevida global ($p=0,069$) talvez pelo grande número de CEC usual (59,7%).

Na nossa análise foram avaliados além de fatores clínico, demográficos e anatomopatológicos clássicos, o tipo de invasão segundo critérios modificados de ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989) que utilizaram com resultados animadores em câncer da cavidade oral, chegando a uma nova gradação de malignidade como indicador prognóstico. Em trabalho prévio do nosso grupo (GUIMARÃES et al. 2006) foi definido dois padrões de infiltração, um padrão de infiltração “regular” onde as células neoplásicas parecem empurrar as células do estroma, e um padrão de invasão do tipo “irregular”, onde as células tumorais invadem permeando o estroma em cordões tumorais. Esta variável

anatomopatológica, porém, não apresentou significância estatística em nossa amostra, na análise univariada ($p=0,717$).

Como os fatores clínicos ou anatomopatológicos isoladamente não têm sido capazes de predizer o risco de metástase linfonodal nos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis, nem na época do diagnóstico bem como no seu seguimento, novos estudos associando-se fatores clássicos a elementos da biologia molecular são uma opção na tentativa de selecionar pacientes com maior risco de metástases linfonodais os quais devem ser tratados de princípio e definir aqueles de baixo risco para metástase, diminuindo a morbidade da terapêutica.

- Imunoistoquímica CD9

Na literatura não há consenso sobre quais os valores de expressão de CD9 nas células tumorais são considerados como valor normal (normal like), valor aumentado (up regulation) e valor diminuído (down regulation), sendo então atribuídos valores retirados da nossa amostra para a definição de pontos de corte para a posterior análise.

Ainda não há determinada a função das tetraspaninas, grupo o qual o CD9 faz parte, mas estudos mostram a capacidade da formação de uma rede em conjunto com as integrinas. O desafio é saber como essa rede das tetraspaninas modifica o comportamento das células. Esse dado é fundamental para saber como as doenças se relacionam com a mutação ou perda de cada tetraspanina (BOUCHEIX e RUBINSTEIN 2001).

Em não havendo artigos científicos sobre a expressão de CD9 na mucosa peniana, avaliamos os diversos estágios da progressão tumoral no câncer de pênis.

Inicialmente, observou-se que a uretra normal expressa fortemente CD9 (Figura 8) em praticamente 100% de suas células. Este dado inédito foi extremamente útil como controle interno da reação e levanta especulações em relação às neoplasias do epitélio urotelial. A mucosa normal apresenta um padrão definido, em que células basais são positivas e à medida que aumenta a diferenciação tecidual, a expressão se reduz. Pode-se perceber que quando a proliferação celular se apresenta aumentada há igualmente aumento da expressão de CD9, sendo máxima nas neoplasias intra-epiteliais. O carcinoma in situ da mucosa peniana praticamente mostra todas as células positivas para CD9 (Figura 7)

Os carcinomas invasivos apresentam padrão diverso de expressão de CD9, com três padrões que podem ser facilmente identificados. O primeiro deles, onde se encontram a maioria dos casos, a expressão é similar à observada no epitélio normal, com a camada de células indiferenciadas perdendo a expressão, mas com a manutenção da expressão nas células diferenciadas. No segundo padrão, mais raro, há a perda marcante da expressão de CD9. Este grupo foi agregado, neste trabalho, aos tumores do primeiro grupo para fins estatísticos, pois não havia diferenças consideráveis entre a expressão baixa e intermediária de CD9 e as variáveis estudadas. Entretanto, esse segundo grupo merece uma análise melhor pela análise de maior número de casos. Já que a perda de expressão de CD9 é geralmente associada a pior prognóstico, como recentemente demonstrado em nosso grupo em CEC de cabeça e pescoço (BUIM et al. 2010). Embora não tenhamos tido sucesso nessa demonstração, a análise de maior número de casos é mandatória para termos dados mais conclusivos.

Finalmente, há um grupo de tumores que mimetizam o carcinoma in situ, em termos de expressão de CD9. Neste, a grande maioria (>80%) das células neoplásicas expressam fortemente CD9 (Figura 6). Este grupo mostrou consistentemente dados associados a pior prognóstico, com dados marginalmente significantes com sobrevida e presença de metástase linfonodal. Este grupo é constituído por tumores pouco diferenciados e com células de padrão basal, que devem ser analisados com bastante atenção em futuro próximo.

A imunoexpressão de CD9 parece interferir na possibilidade de metástases linfonodais e no prognóstico do paciente em diversos tumores diferentes. Como não há nenhum registro da análise da expressão desse anticorpo em câncer de pênis (o único estudo com tetraspaninas é com CD82, cuja diminuição de expressão eleva metástase linfonodal e piora a sobrevida câncer específica (PROTZEL et al. 2008)), utilizaremos os dados da literatura de outros tumores. Em tumores de mama, dois autores, estudando mais de 100 casos demonstraram melhores sobrevidas global e livre de doença como fator independente, além da diminuição de metástase linfonodal axilar (HUANG et al. 1998; MIYAKE et al. 1995); entretanto, JAMIL et al. (2001), nessa mesma neoplasia não demonstraram nenhuma relação com CD9, estudando 113 pacientes. Avaliando câncer de próstata, WANG et al. (2007) apresentaram a expressão de CD9 abaixo de 50% das células tumorais como fator de pior prognóstico, com agressividade tumoral, maior progressão e maior número de metástases; já ZVIERIEV et al. (2005), em estudo experimental em ratos, demonstraram não haver alteração na tumorigênese. Em carcinoma espinocelulares de cabeça e pescoço, há congruência dos estudos na apresentação de bom prognóstico e diminuição de metástase linfonodal nos casos de aumento de expressão de CD9

(KUSUKAWA et al. 2001; EROVIC et al. 2003; MHAWECH et al. 2004; BUIM et al. 2010). Em tumores de ovário epitelial, retinoblastoma e carcinoma urotelial de bexiga, a diminuição de expressão dessa tetraspanina leva a maior invasão tumoral, graus histológicos mais altos e maior número de metástases (MOHAN et al. 2007; HOULE et al. 2002; AI et al. 2007). Análises semelhantes foram feitas por ADACHI et al. (1998) e HIGASHIYAMA et al. (1995) em câncer de pulmão e HASHIDA et al. (2002) e MORI et al. (1998) em neoplasias de cólon. Nos tumores de osso (tipo osteossarcoma) não houve nenhuma relação entre prognóstico e expressão de CD9 (KUBISTA et al. 2004). Entretanto, nos cânceres gástricos, foi encontrado uma relação inversa da expressão dessa tetraspanina: quando houve expressão em mais de 10% das células tumorais, foi identificado um pior prognóstico, com tumores mais agressivos e maior número de metástases linfonodais (HORI et al. 2003; SOYUER et al. 2010).

Em nossa série, a relação entre variação da expressão de CD9 e o potencial de metástases linfonodais ou sobrevida não teve significância estatística. Entretanto, diferente da maioria dos outros tumores, como visto acima, os pacientes que tiveram pior prognóstico foram os que apresentaram up regulation de CD9. Pode-se perceber que houve relação de aumento de expressão de CD9 com invasão perineural e invasão angiolinfática, o que explica a maior invasão e pior sobrevida nesses pacientes.

5.2 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASE LINFONODAL

Para a análise do risco de metástase linfonodal foram avaliados os parâmetros clínico-demográficos e anatomopatológicos do tumor primário, além da imunorreatividade para CD9.

Na análise univariada a infiltração perineural ($p < 0,001$), o estágio clínico N ($p = 0,001$) e o grau histológico ($p = 0,008$) foram os únicos fatores associados com a presença de metástase linfonodal. A infiltração perineural tem se demonstrado nos estudos recentes um promissor indicador de risco para metástase linfonodal e para avaliação de sobrevida em tumor de pênis. O estágio clínico N e o grau histológico seguem dados da literatura como bons preditores de risco de metástase linfonodal.

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, infiltração peri-neural (RR = 8,802; IC 95% [2,168 – 35,737]) e estágio clínico N (RR = 9,318; IC 95% [1,716 – 50,607]), foram fatores independentes de risco para o comprometimento metastático dos linfonodos, reforçando a importância destes fatores clínicos e patológicos no prognóstico dos tumores penianos. A não permanência do grau histológico talvez se deva por uma questão de análise estatística pelo fato de não haver nenhum caso de metástase linfática em pacientes de baixo grau histológico.

5.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA

5.3.1 Sobrevida Câncer Específica

- **Análise univariada**

A taxa de sobrevida câncer específica em 10 anos foi de 83,6%. Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica foi o estadiamento clínico T ($p=0,001$) e o estadiamento clínico N ($p=0,028$). Estas variáveis determinam o estadio clínico, o que confirma a importância do TNM na avaliação das neoplasias, reforçando a necessidade de um exame físico realizado padronizado, como em hospitais de referência.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica estão: grau de diferenciação histológica ($p<0,049$), permeação linfo-vascular ($p=0,003$), infiltração perineural ($p<0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p=0,047$) e presença de metástase linfonodal ($p<0,001$), reforçando a importância anatomia clássica na avaliação desta neoplasia.

Em relação a variável imunoistoquímica CD9 houve uma tendência de pior prognóstico a medida que a expressão de CD9 se eleva, porém não estatisticamente significativa ($p=0,084$)

- **Análise multivariada**

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, infiltração perineural (RR = 4,775; IC 95% [0,878 – 25,977]) e metástase linfonodal (RR = 5,640 IC 95% [1,292 – 24,629]) foram fatores independentes de risco para a sobrevida câncer específica.

5.3.2 Sobrevida Global

- **Análise univariada**

A taxa de sobrevida Global em 10 anos da população estudada foi de 49,3%. Dentre as variáveis clínicas e demográficas nenhuma influenciou significativamente a sobrevida global.

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida Global estão: grau de diferenciação histológica ($p=0,002$), permeação linfo-vascular ($p=0,047$), infiltração perineural ($p<0,001$), infiltração de corpo cavernoso ($p=0,023$), infiltração de uretra ($p=0,021$) e presença de metástase linfonodal ($p<0,001$)

A imunorreatividade para CD9 não apresentou significância estatística para a Sobrevida Global ($p=0,099$), porém assim como a sobrevida câncer específica, é sugestivo um melhor prognóstico quando há up regulation de CD9.

- **Análise multivariada**

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, infiltração perineural ($RR= 2,634$; IC 95% $[1,227 - 5,653]$), e metástase linfonodal ($RR = 2,600$ IC 95% $[1,165 - 5,802]$), foram fatores independentes para risco de óbito. A presença de infiltração perineural no modelo final reforça a sua importância como o fator prognóstico importante para a presença de metástase linfonodal, sendo uma variável que merece investigação em outras séries para comprovar o seu valor na sobrevida global.

6 CONCLUSÕES

- Há uma tendência do aumento da expressão de CD9 a medida que há progressão tumoral, até a invasão tumoral;
- Há associação entre aumento da expressão de CD9, invasão perineural e embolização angiolinfática;
- Não ha relação entre expressão de CD9 e metástase linfonodal;
- O aumento da expressão de CD9 pode estar associado a pior sobrevida global e câncer específica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Aad AS, DeKernion JB. Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. **Urol Clin North Am** 1992; 19:319-24.

Adachi M, Taki T, Konishi T, Huang C, Higashiyama M, Myyake M. Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KA11/CD82 gene expression. **J Clin Oncol** 1998; 16:1397-406.

Adeyouju AB, Thornhill J, Corr J, Grainger R, McDermontt TED, Butler M. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis and implications for management. **Br J Urol** 1997; 80:937-9.

Ai X, Zhang X, Wu Z, Ma X, Ju Z, Wang B, Shi T. Expression of KAI1/CD82 and MRP-1/CD9 in transitional cell carcinoma of bladder. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci** 2007; 27:79-82.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignance grading in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res** 1987; 95:229-49.

Antonelli CBG, Novaes PE, Alves AC, Lopes A. Rhabdomyosarcoma of the penis in a 15-month-old-boy. **J Urol** 1998; 160:2200-1.

Ashley DJB, Edwards EC. Sarcomas of the penis: report of a case with a review of the literature. **Br J Urol** 1957; 45:170-9.

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

Barrasso R, Brux JD, Croissant O, Orth G. High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasm in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. **N Engl J Med** 1987; 317:916-23.

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

Bevan-Thomas R, Slaton JW, Pettaway CA. Contemporary morbidity from lymphadenectomy for penile squamous cell carcinoma: the M.D. Anderson Cancer Center Experience. **J Urol** 2002; 167:1638-42.

Bezerra AL, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus DNA prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. **Am J Surg Pathol** 2001a; 25:673-8.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001b; 91:2315-21.

Boucheix C, Benoit P, Frachet P, et al. Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. **J Biol Chem** 1991; 266:117-22.

Boucheix C; Rubinstein E. Tetraspanins. **Cell Mol Life Sci** 2001; 58:1189-205.

Brinton LA, Juan-Yao L, Shou-De R, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Broker RT. Structure and genetic expression of papillomaviruses. **Obstet Gynecol Clin North Am** 1987; 14:329-45.

Brumini R, Torloni H, Gotlieb SLD, Henson DE, Souza JMP, editores **Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976/80**. Campanha Nacional de Controle do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro. 1982.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignace grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 1989; 18:432-7.

Buddington WT, Kickham CJ, Smith WE. An. assessment of malignant disease of the penis. **J Urol** 1963; 89:442-9.

Buim ME, Lourenço SV, Carvalho KC, et al. Downregulation of CD9 protein expression is associated with aggressive behavior of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2010; 46:166-71.

Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer: clinical presentation, diagnosis and staging. **Urol Clin North Am** 1992; 16:247-56.

Cabanas RM. An approach for the treatment of the penile carcinoma. **Cancer** 1977; 39:456-66.

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

Catalona WJ. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the pênis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. **J Urol** 1988; 140:836.

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

Chaux A; Caballero C; Soares FA; Guimarães GC; Cunha IW; Reuter V; Barreto J; Rodríguez I; Cubilla AL. The prognostic index: a useful pathologic guide for prediction of nodal metastases and survival in penile squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:1049-57.

Chaux A, Soares F, Rodríguez 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, Ayala A, et al. Warty basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm. Report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010b; 23:896-904.

Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. **J Clin Oncol** 2005; 23:1803-10.

Coblentz TR, Theodorescu D. Morbidity of modified prophylactic inguinal lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2002; 168:1386-9.

Colberg JW, Andriole GL, Catalona WJ. Long-term follow-up of men undergoing modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the penis. **Br J Urol** 1997; 79:54.

Cox DR. "Regression Models and Life Tables". **J Royal Stat Society Ser B** 1972; 34:187-220.

Cubilla AL. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **World J Urol** 2008; 27:169-77.

Cunha IW, Guimaraes GC, Soares F, 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.

Cunha RP, Viana G, Lima AO, Bravo A, Branco J, Couto A. Carcinoma epidermóide do pênis com metástase inguinal bilateral em crianças de 12 anos de idade. **J Br Urol** 1981; 7:147-8.

Cupp MR, Malek RS, Goelner JR, Smith TF, Espy MJ. The detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis. **J Urol** 1995; 154:1024-9.

D'ancona CAL, Lucena RGA, Querne FAO, Martins MHT, Denardi F, Netto, Jr. NR. Long-term followup of penile carcinoma treated with penectomy and bilateral modified inguinal lymphadenectomy. **J Urol** 2004; 172:498-501.

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

Das S. Penile amputations for the management of primary carcinoma of the penis. **Urol Clin North Am** 1992; 19:277-82.

Dehner LP, Smith BH. Soft tissue tumors of the penis. **Cancer** 1970; 25:1431-6.

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

Dennis EJ, Heins HC, Latham E, Mciver FA, Pratt-Thomas HR. The carcinogenic effect of human smegma: an experimental study. I. Preliminary report. **Cancer** 1956; 9:671-80.

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

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. IARC Press: Lyon; 2004. Penile cancer; p.279-98.

Ekstrom T, Edsmyr F. Cancer of the penis: a clinical study of 229 cases. **Acta Chir Scand** 1958; 115:25-45.

Erovic BM, Pammer J, Hollemann D, et al. Motility-related protein-1/CD9 expression in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2003; 25:848-57.

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

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

Fegen JP, Beebe D, Persky Y L. Basal cell carcinoma of the penis. **J Urol** 1970; 104:864-6.

Ficarra V, Zattoni F, Cunico SC, et al. Lymphatic and vascular embolizations are independent predictive variables of inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis: Grupo Uro-Oncologico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer data base data. **Cancer** 2005; 103:2507-16.

Ficarra V, Zattoni F, Artibani W, et al. Nomogram predictive of pathological inguinal lymph node involvement in patients With squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:1700-5.

Fishman M, Friedman HF, Stewart HL. Local effect of repeated application of 3,4-benzpyrene and of smegma to the vagina and cervix of mice. **J Natl Cancer Inst** 1942; 2:361-73.

Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. **Hum Pathol** 2002; 33:459-65.

Fraley EE, Zhang G, Manivel C, Niehans GA. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. **J Urol** 1989; 142:1478-82.

Fraley EE, Zhang G, Sazama R, Lange PH. Cancer of the penis. Prognosis and treatment plans. **Cancer** 1985; 55:1618-24.

Frimberger D, Linke R, Meissner H, Stepp H, Zaak D, Hungerhuber E, Waidelich R, Schmeller N, Hofstetter A, Schneidet al. Fluorescence diagnosis: a novel method to guide radical inguinal lymph node dissection in penile cancer. **World J Urol** 2004; 22:150-4.

Frisch M, Friis S, Kjaer SK, Melbye KM. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population (Denmark 1943-90). **BMJ** 1995; 311:1471.

Gentil FC, Lopes A, Epifânio ITN, Cavalcante SF, Souza, Sá AO. Esvaziamento inguino-iliaco: técnica e tática operatória. **Acta Oncol Bras** 1986; 6:83-6.

Golijanin D, Tan JY, Kazior A. Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1024-31.

Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, et al. Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. **Cancer Res** 2005; 65:7127-36.

Graafland NM, Leijte JAP, Valde's Olmos RA, Hoefnagel CA, Teerstra HJ, Horenblas S. Scanning with 18F-FDG-PET/TC for detection of pelvic nodal involvement in inguinal node positive penile carcinoma. **Eur Urol** 2009; 56:339-45.

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; discussion 534.

Guimarães GC, Leal ML, Campos RS, et al. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology** 2007; 70:137-42.

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. **Estudos de fatores prognósticos e da expressão imunoistoquímica de PCNA e MIB-1 / KI-67 em pacientes portadores de CEC de pênis.** São Paulo; 2003. [Dissertação-Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Hadway P, Smith Y, Corbishley C, Heenan S, Watkin NA. Evaluation of dynamic lymphoscintigraphy and sentinel lymph-node biopsy for detecting occult metastases in patients with penile squamous cell carcinoma. **BJU Int** 2007; 100:561-5.

Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and traditional pathologic variables in invasive penile carcinoma assessment of prognostic significance. **Urology** 1998; 52:11-6.

Harish K, Ravi R. The role of tobacco in penile carcinoma. **Br J Urol** 1995; 75:375-7.

Harmer MH. **TNM: Classification of malignant tumors**. 3rd ed. Geneva: International Union Against Cancer; 1978. Penis; p.126-8.

Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, et al. Integrin alpha3 expression as a prognostic factor in colon cancer: association with MRP-1/CD9 and KAI1/CD82. **Int J Cancer** 2002; 97:518-25.

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.

Hermanek P, Sobin LH. **TNM: Classification of malignant tumors**. 4th ed. rev. Berlin: Springer Verlag; 1987. Penis; p.130-2.

Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States, 1998-2003. **Cancer** 2008; 113:2883-91.

Herr HW. Surgery of penile and urethral carcinoma. In: Walsh PC; Retik AB; Stamey TA; Vaughan ED, editors. **Campbell's urology**. 6th ed. Philadelphia, W. B. Saunders; 1992. p.3073-89.

Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, et al. Reduced motility-related-protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. **Cancer Res** 1995; 55:6040-4.

Higginbottom A, Takahashi Y, Bolling L, et al. Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 311:208-14.

Horenblas S, Van Tinteren H, Delemarre JFM, Moonen LMF, Lustig G V, Kroger R. Squamous cell carcinoma of the penis: accuracy of the tumors, nodes and metastasis classification system, and role of lymphangiography, computerized tomography scan and fine needle aspiration cytology. **J Urol** 1991; 146:1279-83.

Horenblas S, Van Tinteren H, Delemarre JFM, Moonen LMF, Lustin V, Van Waardenburg EW. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. **J Urol** 1993; 149:492-7.

Horenblas S, Jansen L, Meinhardt W, et al. Detection of occult metastasis in squamous cell carcinoma of the penis using a dynamic sentinel node procedure. **J Urol** 2000; 163:1000-4.

Horenblas S, Van Tinteren H. Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. **J Urol** 1994; 151:1239-43.

Hori H, Yano S, Koufuji K, Takeda J, Shirouzu K. CD9 expression in gastric cancer and its significance. **J Surg Res** 2004; 117:208-15.

Houle CD, Ding XY, Foley JF, Afshari CA, Barrett JC, Davis BJ. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. **Gynecol Oncol** 2002; 86:69-78.

Huang C, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M. Correlation of reduction in MRCP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. **Am J Pathol** 1998; 153:973-83.

Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. **J Exp Med** 1993; 177:1231-7.

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.

Jackson SM. The treatment of carcinoma of the penis. **Br J Urol** 1966; 53:33-5.

Jamil F, Peston D, Shousha S. CD9 immunohistochemical staining of breast carcinoma: unlikely to provide useful prognostic information for routine use. **Histopathology** 2001; 39:572-7.

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

Johnson DE, Lo RK, Srigley J, Ayala AG. Verrucous carcinoma of the penis. **J Urol** 1985; 133:216-8.

Kamat MR, Kulkarni JN, Tongaonkar HB. Carcinoma of the penis: the Indian experience. **J Surg Oncol** 1993; 52:50-5.

Kattan MW, Ficarra V, Artibani W, et al. Nomogram predictive of cancer specific survival in patients undergoing partial or total amputation for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:2103-8.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Statist Assn** 1958; 53:457-81.

Kayes O, Minhas S, Allen C, Hare C, Freeman A, Ralph D. The role of magnetic resonance imaging in the local staging of penile cancer. **Eur Urol** 2007; 51:1313-9.

Kubista B, Erovic BM, Klinger H, Sulzbacher I, Trieb K. CD9 expression is not a prognostic factor in human osteosarcoma. **Cancer Lett** 2004; 209:105-10.

Kusukawa J, Ryu F, Kameyama T, Mekada E. Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis. **J Oral Pathol Med** 2001; 30:73-9.

Lanza F, Wolf D, Fox CF, et al. cDNA cloning and expression of platelet p24/CD9. Evidence for a new family of multiple membrane-spanning proteins. **J Biol Chem** 1991; 266:10638-45.

Leijte JAP, Gallee M, Antonini N, Horenblas S. Evaluation of current TNM classification of penile carcinoma. **J Urol** 2008; 180:933-8; discussion 938.

Leijte JAP, Kroon BK, Valde's Olmos RA, Nieweg OE, Horenblas S. Reliability and safety of current dynamic sentinel node biopsy for penile carcinoma. **Eur Urol** 2007; 52:170-7.

Leijte JA, Hughes B, Graafland NM, et al. Two-center evaluation of dynamic sentinel node biopsy for squamous cell carcinoma of the penis. **J Clin Oncol** 2009; 27:3325-9.

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

Lont AP, Gallee MPW, Meinhardt W, van Tinteren H, Horenblas S. Penis conserving treatment for t1 and t2 penile carcinoma: clinical implications of a local recurrence. **J Urol** 2006; 176:575-80.

Lopes A. **Fatores clínicos e anatomopatológicas envolvidos no risco de metastases linfonodais e no prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma de pênis tratados por cirurgia.** São Paulo; 1995. [Tese-Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Lopes A, Bezerra AL, Pinto CAL, Serrano SV, Abdon de Mello C, 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.

Lopes A, Bezerra AL, Serrano SV, Hidalgo GS. Iliac nodal metastases from carcinoma of the penis treated surgically. **Br J Urol Int** 2000; 86:690-3.

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

Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. **J Urol** 1996b; 156:1637-42.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Câncer de pênis. **Ambito Hospitalar** 1994; 58:5-13.

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

Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:845-56.

Machado MT, Molina WR Jr, Tavares A, Forseto PH Jr, Juliano RV, Wroclawski ER. Comparative study between videoendoscopic inguinal lymphadenectomy (VEIL) and standard open procedure for penile cancer: preliminary surgical and oncological results. **J Urol** 2005; 173:226.

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

Masellis-Smith A, Shaw AR. CD9-regulated adhesion. Anti-CD9 monoclonal antibody induce pre-B cell adhesion to bone marrow fibroblasts through de novo recognition of fibronectin. **J Immunol** 1994; 152:2768-77.

McDougal WS, Kirchner FK Jr, Edwards RH, Killion LT. Treatment of carcinoma of the penis: the case for primary lymphadenectomy. **J Urol** 1986; 136:38-41.

Meijer RP, Boon TA, Van Venrooij GEPM, Wijburg CJ. Long-term follow-up after laser therapy for penile carcinoma. **Urology** 2007; 69:759-62.

Miyake M, Nakano K, Ieki Y, et al. Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. **Cancer Res** 1995; 55:4127-31.

Mhaweche P, Dulguerov P, Tschanz E, Verdan C, Ares C, Allal AS. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) expression can predict disease-free survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Br J Cancer** 2004; 90:471-5.

Mohan A, Nalini V, Mallikarjuna K, Jyotirmay B, Krishnakumar S. Expression of motility-related protein MRP1/CD9, N-cadherin, E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in retinoblastoma. **Exp Eye Res** 2007; 84:781-9.

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

Mori M, Mimori K, Shirashi T, et al. Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. **Clin Cancer Res** 1998; 4:1507-10.

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.

Nelson BA, Cookson MS, Smith JA Jr, Chang SS. Complications of inguinal and pelvic lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis: a contemporary series. **J Urol** 2004; 172:494-7.

Odland PB. Organ-sparing dermatologic surgical approach to cancer of the penis. In: Raghavan D, Scher HI, Leibel AS, Lnge PH, editors. **Principles and practice of genitourinary oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.943-8.

Ornellas AA, Seixas AL, de Moraes JR. Analyses of 200 lymphadenectomies in patients with penile carcinoma. **J Urol** 1991; 146:330-2.

Ornellas AA, Seixas AL, Marota A, Wisnescky A, Campos F, de Moraes JR. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. **J Urol** 1994; 151:1244-9.

Ozsahin M, Jichlinski P, Weber DC, et al. Treatment of penile carcinoma: to cut or not to cut? **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 66:674-9.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. **Cancer incidence in five continents**. vol. VII. Lyon-France: IARC Scientific Publications; N° 143, 1997.

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

Perinetti E, Crane DB, Catalona WJ. Unreliability of sentinel lymph node biopsy for staging of penile carcinoma. **J Urol** 1980; 124:734-5.

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

Pizzocaro G, Piva L, Bandieramonte G, Tana S. Up-to-date management of carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:5-15.

Pompeo ACL, Koff W, Damião R, et al. **Carcinoma do pênis - Parte II**. Projeto Diretrizes – Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2006. p.1-9. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/6_volume/13-CarcinomaPenisParteII.pdf> [20 05 2010].

Pompeo 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].

Protzel C, Kakies C, Kleist B, Poetsch M, Giebel J. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. **Virchows Arch** 2008; 452:369-75.

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.

Rosemberg SK, Hennan G, Elfonte E. Sexually transmitted papillomaviral infection in male, VII Is cancer of penis sexually transmitted? **Urology** 1991; 37:437-40

Rotolo JE, Lynch JM. Penile cancer: curable with early detection. **Hosp Pract** 1991; 26:131-8.

Saito Y, Tachibana I, Takeda Y, et al. Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. **Cancer Res** 2006; 66:9557-65.

Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. **J Urol** 1992; 147:389-92.

Schellhammer PF, Jordan GH, Schlossberg SM. Tumors of the penis. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED Jr, editors. **Campbell's urology**. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1264-98.

Schuessler WW, Vancaillie TG, Reich H, Griffith DP. Transperitoneal endosurgical lymphadenectomy in patients with localized prostate cancer. **J Urol** 1991; 145:988-91.

Shabad AL. Some aspects of etiology and prevention of penile cancer. **J Urol** 1964; 92:696-702.

Schoen EJ, Oehrli M, Colby C, Machin G. The highly protective effect of newborn circumcision against invasive penile cancer. **Pediatrics** 2000; 105:E36.

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

Skinner DG, Leadbetter WF, Kelley SB. The surgical management of squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 1972; 107:273-7.

Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. **J Urol** 2001; 165:1138-42.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metaloproteinases-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.

Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C, editors. **TNM classification of malignant tumors**. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009. p.239-42.

Solsona E, Iborra I, Ricós JV, et al. Corpus cavernosum invasion and tumor grade in the prediction of lymph node condition in penile carcinoma. **Eur Urol** 1992; 22:115-8.

Solsona E, Iborra I, Rubio J, Casnova JL, Ricós JV, Calabuig C. Prospective validation of the association of local tumor stage and grades as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal nodes. **J Urol** 2001; 165:1506-9.

Soyuer S, Soyuer I, Unal D, Ucar K, Yildiz OG, Orhan O. Prognostic significance of CD9 expression in locally advanced gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy. **Pathol Res Pract** 2010 May 21. [Epub ahead of print]

Srinivas V, Morse MJ, Herr HW, Sogani PC, Whitmore WF Jr. Penile cancer: relation of extent of metastasis to survival. **J Urol** 1987; 137:880-2.

Srougi M, Simon SD, editores. **Câncer urológico**. São Paulo: Platina; 1990. Cancer do pênis; p.439-60.

Staubitz WJ, Lent MH, Oberkircher OJ. Carcinoma of the penis. **Cancer** 1955; 8:371-8.

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

Tabatabaei S, Harisinghani M, McDougal WS. Regional lymph node staging using lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10 in patients with penile cancer. **J Urol** 2005;174:923-7, discussion 927.

Tanis PJ, Lont AP, Meinhardt W, Valdés Olmos RA, Nieweg OE, Horemblas S. Dynamic sentinel node biopsy for penile cancer: reliability of a staging technique. **J Urol** 2002; 168:76-80.

Tewari M, Kumar1 M, Shukla HS. Nd: Yag laser treatment of early stage carcinoma of the penis preserves form and function of penis. **Asian J Surg** 2007; 30:126-30.

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

Tobias-Machado M, Tavares A, Ornellas AA, Molina WR, Jr, Juliano RV, Wroclawski ER. Vídeo endoscopic inguinal lymphadenectomy (VEIL): a new minimally invasive procedure for radical inguinal nodes management in penile cancer patients. **J Urol** 2007; 177:953-7; discussion 958.

Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a populationbased case-control study in Los Angeles County (United States). **Cancer Causes Control** 2001;12:267-77.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. p.184-7.

Vapnek JM, Hricak H, Carrol PR. Recent advances in imaging studies for staging of penile and urethral carcinoma. **Urol Clin North Am** 1992; 19:257-66.

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 MH, et al. Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1995; 4:475-83.

Villa LL, Lopes A. Human papillomavirus DNA sequences in penile carcinomas in Brazil. **Int J Cancer** 1986; 37:853-5.

Villavicencio H, Rubio-Briones J, Regalado R, Chéchile G, Algaba F, Palou J. Grade, local stage and growth pattern as prognostic factors in carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:442-7.

Wang JC, Bégin LR, Bérubé NG, et al. Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with CD9 mRNA modifications. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2354-61.

Wajsman Z, Moore RH, Merrin CE, Murphy GP. Surgical treatment of penile cancer: a follow-up report. **Cancer** 1977; 40:1697-701.

Wesper E, Simon J, Schulman CC. Cabaña approach: is sentinel node biopsy realiable for staging penile carcinoma? **Urology** 1986; 28:278-9.

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 restropective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reation. **Int J Cancer** 1992; 50:694-701.

Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. **Oncology** 2001; 61(Suppl 2):1-13.

Young MJ, Reda DJ, Waters WB. Penile carcinoma: a twenty-five-year experience. **Urology** 1991; 38:529-32.

Zhang F, Kotha J, Jennings LK, Zhang XZ. Tetraspanins and vascular functions. **Cardiovasc Res** 2009; 83:7-15.

Zvieriev V, Wang JC, Chevrette M. Over-expression of CD9 does not affect in vivo tumorigenic or metastatic properties of human prostate cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 337:498-504.

Anexo 1 – Classificação histológica OMS, 2004

I) Tumores malignos epiteliais de pênis
Carcinoma espinocelular
Carcinoma basalóide
Carcinoma Warty (condilomatoso)
Carcinoma verrucoso
Carcinoma papilífero, não especificado de outra forma
Carcinoma sarcomatoso
Carcinoma misto
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma de células de Merkel
Carcinoma de pequenas células do tipo neuroendócrino
Carcinoma sebáceo
Carcinoma de células claras
Carcinoma de células basais
II) Lesões precursoras
Neoplasia intraepitelial grau III
Doença de Bowen
Eritroplasia de Queyrat
Doença de Paget
III) Tumores melanocíticos
Nevo melanocítico
Melanoma
IV) Tumores Mesenquimais
V) Tumores hematopoiéticos
VI) Tumores secundários

Fonte - Adaptado de EBLE et al. (2004)

Anexo 2 - Ficha de Levantamento de Dados

Nº. do Array - _____	
Nº. do AP - _____	
RG _____	
Revisto : (m)microfilme (p) prontuário	
Data da Admissão	
Idade a Admissão (anos) _____	
Estado Civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) outros (9) Ign	
Raça : (1) Branca (2) Amarela (3) Negro (9) Ign	
Sinais / Sintomas : (1) Ferida (2) Dor (3) Inflamação (4) Disúria (5) Prurido (6) Outros (9) Ign.	
Tempo de Evolução (meses) : se ignorado 999	
Antecedentes venéreos: (0) Não (1) Sim (9) Ign	
Postectomia: (0) Não (1) Não relacionada (2) Relacionada (9) Ign	
Situação a 1ª consulta : (1) Biopsiado (2) Amputado (3) Esvaziado (4) Intacto (9) Ign	
Estadiamento cT: (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx	
Estadiamento cN: (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (9) Nx	
Estadiamento cM: (0) M0 (1) M1 (9) Mx	
Data da amputação / ressecção	
Data do anatomo-patológico	
Cirurgia: (1) Amp. Parcial (2) Amp. Total (3) Exérese (4) Postectomia (5) AIIA – Inter-íleoabdominal (6) Emasculação	
Complicações relacionadas a cirurgia: (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) Estenose (4) hemorragia (9) Ign	
Data do esvaziamento:	
Tipo esvaziamento ganglionar: (0) Não (1) Inguinal (2) Inguino-iliaco (9) Ign	
Intenção do esvaziamento : (1) Princípio (2) necessidade (8) ã aplica (9) Ign	
Lateralidade do esvaziamento : (1) Unilateral (2) bilateral (8) ã aplica (9) Ign	
Complicações relacionadas esvaziamento: (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) hematoma (4) necrose (5) linfedema (6) Ruptura vasos (8) ã aplica (9) Ign	
Total de Linfonodos examinados:	
Total de Linfonodos positivos:	
Lateralidade linfonodos positivos: (1) Unilat. (2) Bilateral (8) ã aplica (9) Ign	
Cadeia Positiva: (1) Inguinal (2) Inguinal+Íliaco (3) Íliaco (8) ã aplica (9) Ign	
Histologia: (1) CEC (2) warty (3) papilar (4) giant condiloma (5) sarcomatoide (6) sendo glandular (7) cuniculatum (8) basaloide (9) other (10) verrucoso (11) warty – basaloide (12) uretra (13) pseudo hiperplasia (14) adeno – esquamoso (15) mixed (16) anaplásico (17) Verrucosso Invasivo (18) Warty invasivo	

Bordas : (1) Regulares (2) Irregulares (8) Nao avaliável ☐
Grau(Cubilla): (1) baixo grau (2) intermediário (3) alto grau (8) não avaliável ☐
Local anatômico-AP: (1) LP (2) CS (3) CC (4) DT (5) SK (6) A1B (8) ã aplica ☐
Corpo esponjoso-AP: (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável ☐
Corpo cavernoso-AP: (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável ☐
Uretra-AP: (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável ☐
Invasão vascular-AP: (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável ☐
Invasão perineural-AP: (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável ☐
Thickness-AP (mm): ☐
Index- 1/2/3/4/5/6 e 8 não avaliável ☐
Infiltração de órgãos adjacentes: (0)Não (1)Presente (9)Ign ____ ☐
Alteração sugestiva de HPV (coilocitose): (1)Presente (2)Ausente (9) Ign ☐
Data da recidiva: ____/____/____
Local da recidiva: (0)Não (1)Coto (2)Regional (3)pulmões (4)Ossos ☐
(5) Fígado (6)outros (9)Ign.
Tratamento da recorrência; (1)Não (2)amputação (3)linfadenectomia (4)Rxt ☐
(5)Qt (6)outros (7)cirurgia meta (8) ã aplica (9)Ign.
Data do ultimo seguimento: ____/____/____
Situação no seguimento: (1)Vivo s/ doença (2)Vivo com doença ☐
(3)Óbito por Cancer (4)Óbito por outra causa (5) perdido de vista
Hiperplasia escamosa (Hiperesc) : (0) não tem (1) tem (8)não avaliado ☐
Tipo Hiperplasia escamosa (Thiperesc): (0) flat (1) papilar ☐
(2) pseudoepiteliomatosa (3) verrucosa (4) outras (8) não avaliado
SIL: (0) não tem (1) baixo grau (2) alto grau (8) não avaliado ☐
Tipo de SIL (Tsil): (0) warty (1) escamoso (2) basalóide ☐
(3) warty-basalóide (8) não avaliado
Líquen Escleroso (LS): (0) negativo (1) positivo (8) não avaliado ☐
Tipo de Líquen Escleroso (TLS): (0) típico (1) atípico (8) não avaliado ☐
Uretral: (0) sil negativo (1) sil positivo (8)não avaliado ☐
Localização (macroscopia) : (1) glande (2) prepúcio(3) sulco bálano – prepucial ☐
(4) corpo (5) uretra (6) tumor multicêntrico (7) escroto (8) Não avaliável
(9) recidiva inguinal – interilio (10) tu em coto recidiva
Invasão (macroscopia): (0)não tem (1) corpo esponjoso (2) corpo cavernoso ☐
(3) uretra (4) osso (5) raiz pênis (6) pele (7)escroto (8)Não avaliável
Tamanho do pênis (cm) ☐
Tamanho do Tumor (cm) ☐
Margem (cm) ☐
Margem: (o) negativa (1) positiva (8) não avaliável ☐