

**CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA
EXPRESSÃO PROTÉICA DO COMPLEXO
CD44/ERM (EZRINA/RADIXINA/MOESINA) NO
CARCINOMA DE PÊNIS**

JULIANA BARTHOLO DE ANDRADE

**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

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Andrade, Juliana Bartholo de

Correlação clínico-patológica da expressão protéica do complexo cd44/ERM (Ezrina/Radixina/Moesina) no carcinoma de pênis / Juliana Bartholo de Andrade – São Paulo, 2009.

91p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DE PÊNIS 2. IMUNOHISTOQUÍMICA
3. ADESÃO CELULAR 4. CD44/ERM

Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa (Ricardo Reis)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Fernando Augusto Soares, pelos ensinamentos e por me proporcionar a oportunidade de realizar o meu projeto de Mestrado.

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães pela atenção e pelo auxílio na realização de toda a estatística deste trabalho.

Ao Departamento de Anatomia Patológica por possibilitar todo o desenvolvimento do meu projeto, através da colaboração de seus funcionários e de sua infra-estrutura.

Aos técnicos José Ivanildo Neves pelo auxílio na realização das reações imunoistoquímicas.

Às amigas de pós-graduação Juliana, Luciana e Maria José, que tornaram estes anos de estudos muito mais alegres.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Anatomia Patológica, principalmente à Marcilei e à Cláudia por todos os ensinamentos, pela disposição, pela colaboração na realização das reações imunoistoquímicas e na análise das lâminas no ACIS III, e por toda a paciência e carinho.

À secretaria de pós-graduação, especialmente à Ana Kuninari e à Luciana Pitombeira pelas orientações, pela compreensão e pelo carinho.

A todos os colaboradores da Biblioteca que sempre estiveram dispostos a ajudar no que fosse preciso para a realização deste trabalho.

À Suely Francisco e à Francyne Pólen pelo auxílio na diagramação final deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Denize, Ciça, Thatiana, Andréia, Denise e Tati Murad por compreenderem minha “ausência” e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus pais, Maria Stela e Antonio José, aos meus avós Aymar e Vera, e ao meu querido irmão, Fabiano, minhas maiores riquezas, porque sem eles eu nada seria. Muito obrigada por acreditarem no meu sucesso,

por vibrarem com minhas conquistas e por sempre estarem presentes me encorajando a lutar pelos meus sonhos.

RESUMO

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

A metástase linfonodal é o fator prognóstico mais importante em pacientes com carcinoma de pênis. O entendimento de processos biomoleculares que possam estar envolvidos na disseminação metastática deve ampliar as ferramentas disponíveis para uma melhor avaliação dos pacientes, permitindo, assim, um planejamento terapêutico mais adequado, evitando morbidade de cirurgias desnecessárias. Alguns estudos têm demonstrado a influência dos processos de adesão celular no desenvolvimento da tumorigênese e metástase, sendo as proteínas do complexo CD44/ERM (Ezrina/Radixina/Moesina), apontadas como envolvidas nestes processos.

Objetivos: Avaliar as expressões protéicas do CD44 e da família ERM (Ezrina/Radixina/Moesina) no carcinoma de pênis, bem como correlacioná-las ao quadro clínico-patológico e ao comportamento clínico da doença.

Casuística, Materiais e Métodos: Foram selecionados, retrospectivamente, 384 pacientes submetidos à cirurgia para carcinoma epidermóide de pênis, com ou sem linfadenectomia inguino-iliaca, no Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, no período compreendido entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000. A avaliação das expressões de CD44 e da família ERM (Ezrina/Radixina/Moesina) foi realizada por imunoistoquímica em blocos de TMA (tissue microarray), posteriormente analisados por microscopia digital no sistema ACIS III (Dako®). As imunorreatividades de CD44, Ezrina e Moesina foram categorizadas em forte, fraca e negativa; A imunorreatividade de Radixina foi categorizada em positiva e negativa. A associação entre as variáveis foi realizada usando o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. O cálculo dos estimadores da probabilidade de sobrevida foi realizado pela técnica de Kaplan-Méier e as comparações entre

as curvas foram realizadas pelo teste de Log rank. **Resultados:** 35,2% dos casos apresentaram expressão forte para CD44, 12,5% apresentaram expressão forte para Ezrina e 52,6% para Moesina. 44,0% apresentaram expressão positiva para Radixina. A expressão diminuída de CD44 correlacionou-se significativamente com a invasão perineural ($p=0,048$) e com a infiltração de corpo cavernoso ($p=0,007$). A expressão positiva de Ezrina correlacionou-se significativamente com a postectomia ($p=0,014$) e com o grau de diferenciação histológica do tumor ($p=0,001$). Não houve nenhum tipo de correlação significativa com a expressão de Radixina, embora ela tenha se mostrado praticamente significativa com relação à idade ($p=0,05$). A expressão positiva de Moesina correlacionou-se significativamente com a postectomia ($p=0,001$) e com a raça ($p=0,030$). Ezrina influenciou significativamente a sobrevida livre de doença ($p=0,025$).

Conclusão: A expressão protéica de Ezrina, no carcinoma de pênis, parece ser fator prognóstico independente na sobrevida livre de doença, podendo vir a ser um importante marcador molecular no carcinoma de pênis. Porém, os resultados sugerem que são necessárias outras investigações para melhor definir o padrão de expressão do complexo CD44/ERM.

SUMMARY

Andrade JB. **[Clinicopathological correlation of protein expression of complex CD44/ERM (Ezrin/ Radixin/Moesin) in penile carcinoma]**. São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The lymph node metastasis is the most important prognostic factor in patients with penile carcinoma. The understanding of molecular processes that may be involved in metastatic spread should increase the tools available to better assess patients, thus allowing a more appropriate treatment planning, avoiding morbidity of unnecessary surgery. Some studies have emphasized the influence of cellular adhesion in the development of tumorigenesis and metastasis, and the proteins of the CD44/ERM (Ezrin / Radixin / Moesin), cited as involved in these processes. **Objectives:** To evaluate the expressions of CD44 protein family and ERM (Ezrin / Radixin / Moesin) in penile carcinoma, and correlate them to the clinical-pathological and clinical behavior of disease. **Samples, Materials and Methods:** We selected retrospectively 384 patients undergoing surgery for squamous cell carcinoma of the penis, with or without inguinal-iliac lymphadenectomy at the Centre for Treatment and Research, Hospital AC Camargo (São Paulo, Brazil) in the period from January 1953 to December 2000. The evaluation of the expressions of CD44 and family ERM (Ezrin / Radixin / Moesin) was performed by immunohistochemistry in blocks of TMA (tissue microarray), and subsequently analyzed by digital microscopy system ACIS III (Dako ®). The immunoreactivity for CD44, Ezrin and Moesin were categorized as strong, weak and negative; The immunoreactivity for Radixin was categorized into positive and negative. The chi-square or Fisher exact test was used to correlate the variables. Estimators for survival likelihood were calculated using the Kaplan-Meier technique the curves were compared using the Log-rank test. Results: 35.2% of the cases showed strong expression for CD44, 12.5% showed strong expression for Ezrin and 52.6% for Moesin.

44.0% showed positive expression for Radixin. The decreased expression of CD44 was significantly correlated with perineural invasion ($p = 0.048$) and infiltration of the cavernous body ($p = 0.007$). The positive expression of Ezrin was significantly correlated with circumcision ($p = 0.014$) and with the degree of tumor differentiation ($p = 0.001$). There was no such correlation with the expression of Radixin, although it has been shown to be practically significant with age ($p = 0.05$). The positive expression of Moesin correlated significantly with the circumcision ($p = 0.001$) and race ($p = 0.030$). Ezrin influenced significantly disease-free survival ($p = 0.025$). **Conclusion:** Ezrin protein expression in penile carcinoma, seems to be an independent prognostic factor in disease-free survival, being able to become an important molecular marker in penile carcinoma. However, the results suggest that further investigations are needed in order to better define the expression pattern of the complex CD44/ERM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama esquemático da estrutura gênica de CD44.....	9
Figura 2	Estrutura esquemática da proteína CD44.....	10
Figura 3	Desenho esquemático da conformação inativa e ativa de ERM.....	14
Figura 4	Esquema ilustrativo da construção do TMA.....	19
Figura 5	Ilustração da plataforma ACIS III (Automated Cellular Imaging System-DAKO®).....	25
Figura 6	Ilustração do monitor do computador acoplado ao sistema ACIS III com imagens escaneadas a serem analisadas.....	25
Figura 7	Imunorreatividade forte obtida para CD44 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	37
Figura 8	Imunorreatividade fraca obtida para CD44 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	37
Figura 9	Imunorreatividade negativa obtida para CD44 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	38
Figura 10	Imunorreatividade forte obtida para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	38
Figura 11	Imunoreatividade fraca obtida para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	39

Figura 12	Imunorreatividade negativa obtida para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	39
Figura 13	Imunorreatividade positiva obtida para Radixina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	40
Figura 14	Imunorreatividade negativa obtida para Radixina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	40
Figura 15	Imunorreatividade forte obtida para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	41
Figura 16	Imunorreatividade fraca obtida para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	41
Figura 17	Imunorreatividade negativa obtida para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.....	42
Figura 18	Curva de Sobrevida Câncer Específica para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000..	55
Figura 19	Curva de Sobrevida Livre de Doença para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	60
Figura 20	Curva de Sobrevida Global para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	65

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Freqüência das variáveis demográficas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	30
Tabela 2	Freqüência das variáveis clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	31
Tabela 3	Freqüência das variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.	32
Tabela 4	Tipo de cirurgia realizada nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	33
Tabela 5	Intenção do esvaziamento linfonodal nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	33
Tabela 6	Tipo de esvaziamento linfonodal realizado nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.	34
Tabela 7	Lateralidade da linfadenectomia nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	34

Tabela 8	Número de linfonodos positivos ao exame anatomopatológico nos 116 pacientes portadores de carcinoma de pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000, submetidos à linfadenectomia.....	35
Tabela 9	Imunorreatividade das proteínas estudadas de acordo com seus parâmetros obtidos nos 248 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	36
Tabela 10	Imunorreatividade de CD44 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	43
Tabela 11	Imunorreatividade de CD44 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	44
Tabela 12	Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	45
Tabela 13	Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	46
Tabela 14	Imunorreatividade de Radixina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	47

Tabela 15	Imunorreatividade de Radixina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	48
Tabela 16	Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	49
Tabela 17	Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	50
Tabela 18	Status linfonodal de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	51
Tabela 19	Status linfonodal de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	52
Tabela 20	Status linfonodal de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	53
Tabela 21	Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Risco de Metástase Linfonodal. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.....	54

Tabela 22	Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica, em cinco anos, de acordo com variáveis clínico-demográficas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	56
Tabela 23	Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica, em cinco anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	57
Tabela 24	Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica, em cinco anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	58
Tabela 25	Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Sobrevida Câncer Específica. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.....	59
Tabela 26	Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença, em cinco anos, de acordo com variáveis clínico-demográficas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	61
Tabela 27	Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença, em cinco anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	62

Tabela 28	Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença, em cinco anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	63
Tabela 29	Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Sobrevida Livre de Doença. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.....	64
Tabela 30	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global, em cinco anos, de acordo com variáveis clínico-demográficas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	66
Tabela 31	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global, em cinco anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	67
Tabela 32	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global, em cinco anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.....	68
Tabela 33	Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Sobrevida Global. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.....	68
Quadro 1	Correlação das variantes de CD44 com determinados tipos de tumor.....	12

Quadro 2	Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunoistoquímica.....	23
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACIS III	Automated Cellular Imaging System III
Akt	Proteína quinase B
CD44	“cluster of differentiation 44”
CD44s	“cluster of differentiation 44” “standard isoform”
CD44v	“cluster of differentiation 44” “variant isoform”
CD82	“cluster of differentiation 82”
DAB	Diaminobenzidine
DO	Densidade Óptica
E-caderina	Proteína E-caderina
ECMR III	“extracellular matrix receptor III”
EUA	Estados Unidos da América
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCAM	“homing cell adhesion molecule”
H₂O₂	Água Oxigenada
HPV	“human papillomavirus”
mRNA	“messenger ribonucleic acid”
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	“tumor protein 53”
PBS	“phosphate buffered saline”
PGP-1	“phagocytic glycoprotein-1”
PI3-Kinase	“phosphoinositide-3-kinase”
PIP₂	“phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate”
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SPSS	Statistical Package for Social Science
SUS	Sistema Único de Saúde
TMA	“tissue microarray”
TNM	Classificação de Tumores Malignos TNM (T descreve o tamanho do tumor, N linfonodo regional e M metástases)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma de Pênis	1
1.2	Adesão celular	7
1.3	Proteína CD44	8
1.4	ERM (Ezrina, Radixina, Moesina).....	13
2	OBJETIVOS	16
3	CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1	Critérios de Inclusão	18
3.2	Critérios de Exclusão	18
3.3	Construção do “Tissue Microarray”	18
3.4	Imunoistoquímica	20
3.5	Microscopia Digital	24
3.6	Análise Estatística	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Aspectos Demográficos e Clínicos	29
4.2	Aspectos Anatomopatológicos	31
4.3	Aspectos Cirúrgicos.....	33
4.4	Aspectos Imunoistoquímicos	36
4.5	Avaliação do Risco de Metástase Linfonodal	50
4.6	Análise de Sobrevida.....	54
4.6.1	Sobrevida Câncer Específica	54
4.6.2	Sobrevida Livre de Doença	59
4.6.3	Sobrevida Global	64
5	DISCUSSÃO	70

6	CONCLUSÕES	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de levantamento de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE PÊNIS

Considerada uma doença rara nos países desenvolvidos, o carcinoma de pênis corresponde de 0,4 a 0,6% de todas as neoplasias malignas, permanecendo sua incidência de 0,2/100.000 habitantes, nos Estados Unidos da América (EUA), estável nos últimos 25 anos (WATERHOUSE et al. 1982; PERCY et al. 1990; MOSCONI et al. 2005; BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007). De acordo com o National Câncer Institute, a estimativa em 2009 foi de 1.290 novos casos de carcinoma de pênis e de 300 mortes decorrentes da doença.

Em algumas regiões pouco desenvolvidas, ou em desenvolvimento, da África, Ásia e América do Sul, chega a corresponder a 20% das neoplasias malignas no homem (RAJU et al. 1985). Sua maior incidência aparece nas regiões de Barshi, Paranda e Bhum, na Índia (3,32/100.000 habitantes) e seus menores índices aparecem entre os judeus nascidos em Israel e EUA (0/100.000 habitantes e 0,07/100.000 habitantes, respectivamente). Comparando-se níveis sociais semelhantes, parece não haver distinção entre etnias negra e branca (VATANASAPT et al. 1995). Ocorre, principalmente, a partir da sexta década de vida, não sendo freqüente em adultos com idade inferior a 30 anos e raro em crianças (DEAN

1935; DERRICK et al. 1973; MEGALLI et al. 1973; NARASIMHARAO et al. 1985).

Sabe-se que no Brasil ainda é uma doença freqüente, embora faltem dados mais acurados. Em 1982 o carcinoma de pênis correspondia a 2,1% de todas as neoplasias malignas, tendo a sua incidência aumentada nas regiões Norte e Nordeste, aonde são piores as condições sócio-econômicas da população (BRUMINI 1982). Apesar da alta incidência desta neoplasia, ainda não há no Brasil um estudo epidemiológico multicêntrico realizado (FAVORITO et al. 2008). Este fato resulta em dados pouco confiáveis em relação aos aspectos mais básicos da lesão.

Em inquérito voluntário realizado, recentemente, pela Sociedade Brasileira de Urologia – SBU, foram comunicados 283 casos novos da doença no ano de 2006. Nesta casuística foram identificados alguns fatos que fogem ao conhecimento tradicional do carcinoma de pênis. Aproximadamente 20% dos casos ocorreram em pacientes abaixo dos 45 anos de idade (7,5% abaixo dos 35 anos de idade!) e 58% dos casos corresponderam a estágio avançado (T2-T4) da doença. No Maranhão, cerca de 12% dos pacientes submetidos à cirurgia estavam abaixo dos 30 anos (GLINA, comunicação pessoal).

A análise dos dados do Data/SUS permite verificar que o Sistema Único de Saúde (SUS) é responsável por pagar cerca de 1000 penectomias por ano. Em recente campanha de prevenção do carcinoma de pênis desenvolvida no Maranhão, foram realizadas 89 postectomias de pacientes com fimose e sem outras queixas. Destes casos, 15 foram identificados

como carcinoma de pênis (CALIXTO, informação pessoal). Estes dados, embora bastante elementares, demonstram a triste realidade do carcinoma de pênis no Brasil.

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

Dessa forma, a circuncisão tem importante fator protetor nesta neoplasia, remetendo aos aspectos religiosos e culturais um papel fundamental na sua incidência, assim como a idade da realização da mesma (JOHNSON et al. 1973; FREW et al. 1976). Nos judeus postectomizados logo após o nascimento, a incidência referida em alguns trabalhos é nula. Na Índia, nos muçulmanos operados entre os três e 12 anos de idade, a freqüência é de 0,15%, enquanto que nos hindus não operados, a freqüência chega a 3,1% (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; LOPES et al. 1993).

A etiopatogenia do carcinoma de pênis ainda é pouco conhecida, sendo, recentemente, relacionada à infecção pelo HPV (do inglês “human papillomavirus”), ao número de parceiros sexuais e à exposição ao tabaco (HELLBERG et al. 1987; BRINTON et al. 1991; ROSEMBERG 1991).

O HPV afeta o epitélio escamoso da genitália masculina da mesma forma que afeta a genitália feminina, incluindo a formação de condilomas e a transformação neoplásica (JOHNSON et al. 1992). O HPV 6 e o HPV 11 são os dois tipos mais comumente associados a lesões não displásicas, como

verrugas genitais, podendo, também, ser encontrado no carcinoma verrucoso. Já os tipos 16, 18, 31 e 33 são associados aos carcinomas *in situ* e invasivo (WIENER e WALTHER 1995). O HPV 16 é o mais freqüentemente detectado na lesão primária, tendo sido descrito também nas lesões metastáticas (VARMA et al. 1991; IWASAWA et al. 1993).

O número de parceiros sexuais é descrito como fator de risco, provavelmente, pela maior incidência de infecção pelo HPV, com positividade variando entre 31% e 63% dos casos de câncer peniano (WIENER et al. 1992; MADEN et al. 1993), variabilidade esta, que indica a possibilidade de haver fatores adicionais envolvidos.

Geralmente, a doença manifesta-se como uma lesão em glândula, que, se não tratada, estende-se para o prepúcio e para o corpo, invadindo corpos cavernosos e uretra, podendo chegar à auto-amputação. Metástases linfonodais para a região femoral e ilíaca são vias de disseminação precoce (NARAYANA et al. 1982; LOPES et al. 1994; PERSKY e DEKERNION 1986). Metástases por via hematogênica são incomuns e correspondem de um por cento a 10% dos casos (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978). Nos casos mais avançados, as complicações loco-regionais, com tumor infiltrando feixe vâsculo-nervoso, levando à hemorragia e septicemia são as principais causas de morte (PURAS et al. 1978; POMPEU 1993).

As lesões pequenas, em estágio inicial, podem ser tratadas com ressecção convencional ou radioterapia. Excepcionalmente, pode ser realizado a técnica micrográfica de Mohs ou laser (MOHS et al. 1992). Nos casos avançados, a amputação parcial ou total ainda se faz necessária.

A presença de linfonodos palpáveis ao diagnóstico varia de 20% a 96% dos casos (SUFRIN e HUBEN 1987; HEGARTY et al. 2006) e cerca de 50% dos linfonodos inguinais, clinicamente tumorais, não apresentam comprometimento anátomo-patológico pelo tumor. A linfonodomegalia, nestes casos, ocorre como consequência de infecção associada ao tumor primário (BEGGS e SPRATT 1964; CATALONA 1980; LOPES et al. 1996). Por outro lado, 20% dos pacientes com linfonodos clinicamente negativos apresentam metástases microscópicas (BEGGS e SPRATT 1964; DEKERNION et al. 1973).

A dissecação linfonodal ínguino-ilíaca é parte importante da terapêutica, porém, apresenta índices elevados de morbidade e a seleção dos pacientes deve ser criteriosa (BEGGS e SPRATT 1964; KAMAT et al. 1993; COBLENTZ e THEODORESCU 2002). As principais complicações são: a necrose dos retalhos em 14% a 16% dos casos, a infecção de ferida operatória em 10% dos casos e o seroma e o linfedema em 19% a 50% dos casos (HERR 1992).

Cerca de 95% dos casos de carcinoma de pênis são constituídos por carcinomas derivados do epitélio pluriestratificado, tanto da glândula como do sulco coronal e prepúcio (CUBILLA et al. 1993; VELAZQUEZ e CUBILLA 2007).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou a classificação histopatológica dos carcinomas de pênis, na qual se destaca uma grande variedade de subtipos, tais como, carcinoma basalóide, as variantes verrucosas (condilomatoso, papilífero e verrucoso) e os

carcinomas sarcomatóides (CUBILLA et al 2004). Como se trata de uma classificação ainda recente, é necessário validar a relevância clínica destas variantes. Novos tipos histológicos têm sido descritos, como o carcinoma pseudoglandular (CUNHA et al 2009).

Outros tipos histológicos ainda não reconhecidos na classificação da OMS, como o carcinoma cuniculatum, carcinoma pseudo-hiperplásico, carcinoma “wharty”-basalóide e carcinoma verrucoso híbrido merecem uma melhor descrição para serem incluídos na revisão desta classificação (CUBILLA, informação pessoal).

Os dados morfológicos, além da classificação correta do subtipo, podem dar informações bastante úteis em relação ao comportamento biológico do tumor. Dentre elas, podemos destacar o grau histológico do tumor, a invasão vascular (VELAZQUEZ et al. 2008), a invasão perineural (CUBILLA et al. 2007) e o padrão de invasão do tumor (GUIMARÃES et al. 2006b), como aspectos importantes na predição das metástases linfonodais e da sobrevida do paciente.

Todos estes fatores anatomopatológicos e clínicos são insuficientes para o estadiamento preciso do tumor. O estudo de fatores biomoleculares deve ampliar as ferramentas disponíveis para uma melhor avaliação dos pacientes (LOPES et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2006b; CAMPOS et al. 2006), permitindo, assim, um planejamento terapêutico mais adequado, evitando morbidade de cirurgias desnecessárias.

1.2 ADESÃO CELULAR

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

No tecido epitelial, as células ligam-se fortemente umas às outras em camadas denominadas epitélio. A matriz extracelular em contato direto com a camada epitelial consiste principalmente de uma fina camada, a lâmina basal. As células estão ligadas umas às outras por adesões célula-célula, as quais suportam grande parte do estresse mecânico. Para que ocorram essas adesões, filamentos protéicos intracelulares atravessam o citoplasma de cada célula epitelial e liga-se a junções especializadas na membrana citoplasmática, que mantêm as superfícies de células adjacentes unidas umas às outras ou à matriz extracelular (ALBERTS et al. 2004).

A adesão entre as células epiteliais é um fenômeno fundamental para a manutenção da homeostasia do tecido. Esta adesão ocorre em quatro diferentes complexos celulares: junções aderentes (tight junctions), desmossomas, zônula oclusiva e junção comunicante (gap junction), cada uma delas com funções distintas (JUNQUEIRA e CARNEIRO 1997).

Um dos mecanismos básicos mais importantes da biologia celular do tumor é a propriedade das células malignas em alterar a sua adesão a outras células e à matriz extracelular. Isso promove o potencial das células

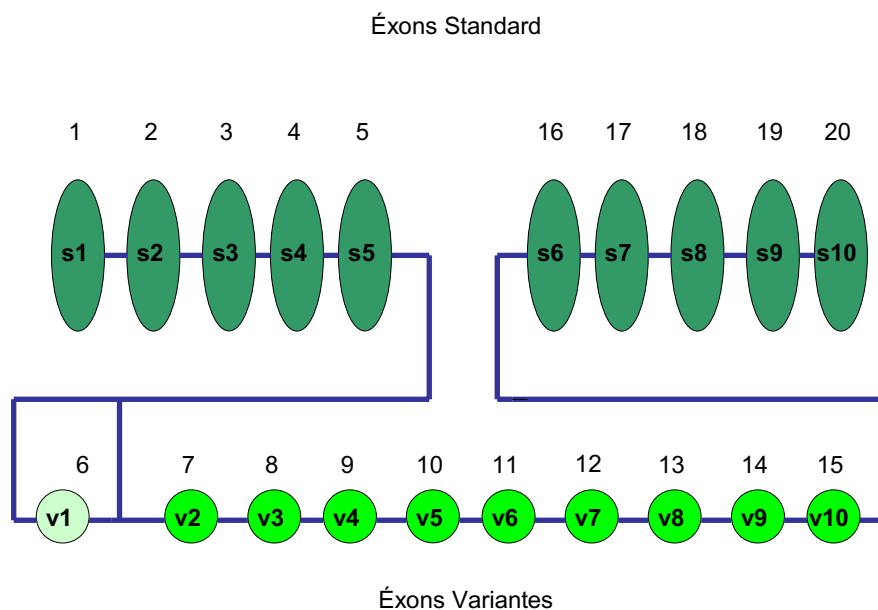
tumorais em se desprenderem do seu sítio original de crescimento e, dessa forma, invadir tecidos adjacentes através do processo conhecido como metástase.

Um exemplo típico de proteína de adesão celular que sofre mudanças estruturais e funcionais dramáticas durante a transformação maligna do tumor é a CD44.

1.3 PROTEÍNA CD44

Produto de um único gene, localizado no braço curto do cromossomo 11 (GOODFELLOW et al. 1982), CD44 representa uma família de glicoproteínas transmembranas receptoras de hialuronato (ácido hialurônico), envolvida na interação célula-célula e célula-matriz extracelular (RUDZKI e JOTHY 1997; GOODISON et al. 1999). Pode também ser chamada de Pgp-1 (phagocytic glycoprotein) (ZHOU et al. 1989), HCAM (hyaluronate receptors) (GOLDSTEIN et al. 1989), Hermes antigen (JALKANEN et al. 1986) e ECMR III (extracellular matrix receptor III) (WAYNER et al. 1988).

Sua estrutura é composta por 20 éxons, dos quais 10 deles (V1-V10) são éxons variantes, que combinados de formas diferentes, inserem-se no domínio extracelular. Os outros 10 éxons restantes (S1-S10) representam a isoforma Standard (GOODFELLOW et al. 1982) (Figura 1).

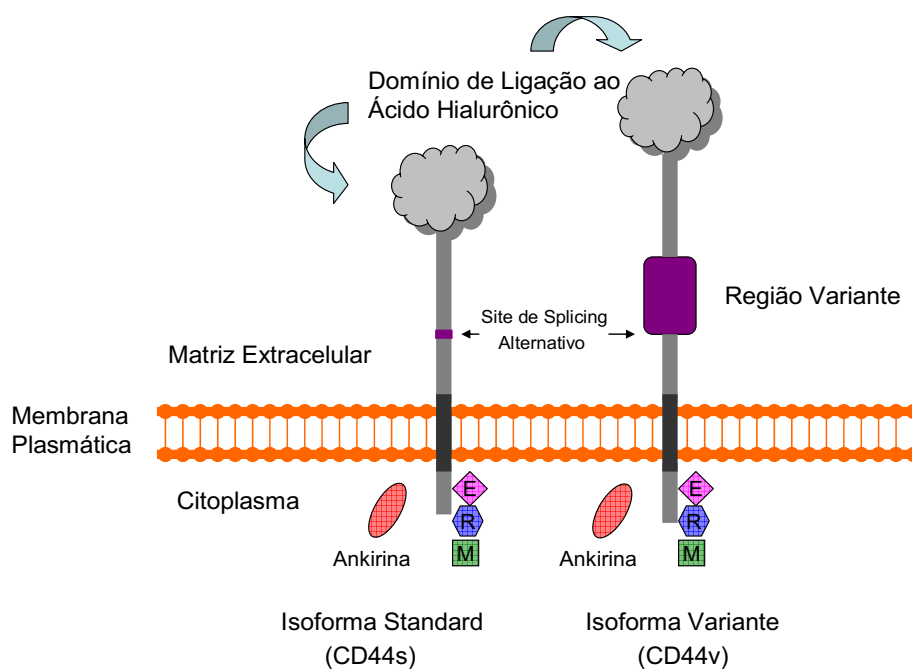


Fonte: Adaptado de GOODISON et al. (1999)

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

Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura gênica de CD44.

Expresso constitutivamente em células epiteliais de proliferação ou em linfócitos ativos, seu domínio citoplasmático comunica-se com o citoesqueleto através da família ERM (do inglês Ezrin/Radixin/Moesin) e da ankirina (RUDZKI e JOTHY 1997), como pode ser visto na Figura 2. Os hepatócitos, células acinares do pâncreas e células tubulares do rim e do pâncreas não expressam CD44 (TERPE et al. 1994a; MACKAY et al. 1994), assim como epêndima, epitélio do plexo coróide, superfícies do epitélio do estômago e do intestino, glândula adrenal, epitélio germinativo do ovário, células germinativas testiculares, músculo estriado, células de Sertoli e astrócitos (RUDZKI e JOTHY 1997).



Fonte: Adaptado de GOODISON et al. (1999)

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

Figura 2 - Estrutura esquemática do complexo CD44/ERM.

Estudos *in vitro* indicaram que a modificação da expressão de CD44 resulta num ligante diferente de receptor e isso influencia a motilidade celular, as propriedades invasivas e o potencial metastático do tumor, já que se rompe a interação normal epitélio mesênquima, contribuindo, assim, para a desorganização estrutural e funcional presente no câncer (RUDZKI e JOTHY 1997; GOODISON et al. 1999).

STAMENKOVIC et al. (1989; 1991) mostraram em seus estudos, que os tecidos tumorais contêm uma superexpressão de CD44 em relação ao número presente no tecido normal correspondente. Isso comprova a idéia de

que a expressão de várias isoformas de CD44 pode influenciar na tumorigênese e no processo metastático.

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

Diversos estudos demonstraram que em diferentes tipos de câncer mais de uma isoforma pode estar envolvida na progressão tumoral. Em linfomas observou-se alta expressão das isoformas contendo as variantes V3, V6 e V9 (KOOPMAN et al. 1993; TERPE et al. 1994b). A variante V5 é encontrada com expressão elevada em melanomas, porém melanócitos não neoplásicos não apresentam isoformas variantes, apenas CD44 Standard (HOFMANN et al. 1991; MANTEN-HORST et al. 1995). A elevada expressão de V6 está, freqüentemente, associada aos diversos achados clínicos e morfológicos, como, por exemplo, a metástase linfonodal (RUDZKI e JOTHY 1997).

Análises imunoistoquímicas em tecido colorretal usando-se anticorpos monoclonais reconheceram todas as variantes das isoformas de CD44, demonstrando que podem ser encontradas tanto em adenomas como em carcinomas (KIM et al. 1994).

O quadro a seguir ilustra algumas das variantes de CD44 encontradas em determinados tipos de tumor, bem como sua relevância na progressão tumoral.

Quadro 1 - Correlação das variantes de CD44 com determinados tipos de tumor.

Tipo de Tumor	Expressão de CD44	Relevância da Progressão do Tumor
Carcinoma de Pâncreas (Gansauge et al. 1995)	V6	Desconhecida
Linfoma não-Hodgkin (Stauder et al. 1995)	V3, V6, V9	Prognóstico ruim
Melanoma (Manten-Horst et al. 1995)	V5	Biologicamente mais agressivo
Carcinoma de cólon (Mulder et al. e Finke et al. 1995)	V5, V6	Correlação com transformação maligna
Carcinoma gástrico (Miwa et al. 1996; Yamaguchi et al. 1995)	V8-V10	Correlação com metástase
Carcinoma de tiróide (papilar) (Figge et al. 1994)	V6	Correlação com metástase linfonodal

Fonte: Adaptado de RUDZKI e JOTHY (1997)

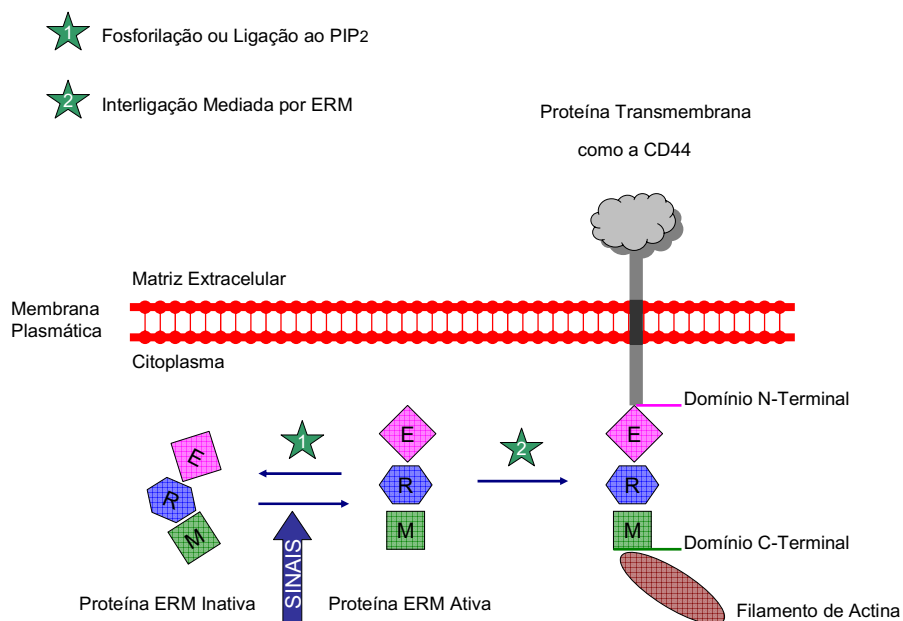
1.4 ERM (EZRINA, RADIXINA, MOESINA)

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

Uma função normal das estruturas do citoesqueleto de actina é a de enrijecer ou promover a mudança da forma da membrana plasmática. Em

muitos casos, os arranjos do citoesqueleto têm a função adicional de auxiliar na conexão das estruturas internas das células ao seu microambiente, incluindo a conexão a outras células ou a proteínas transmembranas. Os filamentos de actina são críticos para o estabelecimento dessas conexões.

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



Fonte: Adaptado de ALBERTS et al. (2004)

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

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

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

tumoral e metástase. Segundo eles, o aumento na expressão de CD44 leva a um aumento funcional da ativação de Ezrina.

Assim, os membros da família ERM têm sido alvos não somente de estudos sobre a sua atuação nos filamentos de actina, mas também de estudos envolvendo adesão e crescimento celular (TSUKITA et al. 1994).

Diante desses achados e do fato de não se conhecer ao certo o padrão de expressão do complexo CD44/ERM nos diversos tipos de câncer, o presente estudo traz a possibilidade de se analisar a expressão do mesmo no carcinoma de pênis, correlacionando-o ao quadro clínico-patológico, além da oportunidade de se obter maiores conhecimentos para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tal neoplasia.

2 OBJETIVOS

- Avaliar as expressões protéicas do CD44 e da família ERM (Ezrina, Radixina e Moesina) no carcinoma de pênis.
- Correlacionar as expressões protéicas de CD44, Ezrina, Radixina e Moesina ao quadro clínico-patológico do carcinoma de pênis.
- Correlacionar as expressões protéicas de CD44, Ezrina, Radixina e Moesina ao comportamento clínico no carcinoma de pênis.

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, no qual foram selecionados pacientes submetidos à cirurgia para carcinoma epidermóide de pênis, com ou sem linfadenectomia inguino-ilíaca, no Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C Camargo, no período compreendido entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica todos os blocos de parafina referentes aos pacientes previamente selecionados e passíveis de confirmação diagnóstica, perfazendo um total de 384 casos. Os registros dos pacientes foram obtidos através do arquivo do próprio Departamento de Anatomia Patológica.

Os dados clínico-patológicos dos casos analisados foram recuperados a partir do banco de dados já revisado pelo grupo de estudos do câncer de pênis.

A partir do material existente nos blocos de parafina foram construídos blocos de “Tissue Microarray” (TMA) e, posteriormente, realizaram-se colorações imunoistoquímicas nos cortes confeccionados através dos blocos em questão para a avaliação das expressões de CD44, Ezrina, Radixina e Moesina.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Casos de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis, submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário e à linfadenectomia regional, uni ou bilateral, em qualquer momento do seu seguimento, ou pacientes que tenham seguimento adequado por pelo menos cinco anos.
- Casos que tenham material arquivado suficiente para novos cortes histológicos e confirmação do diagnóstico.

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

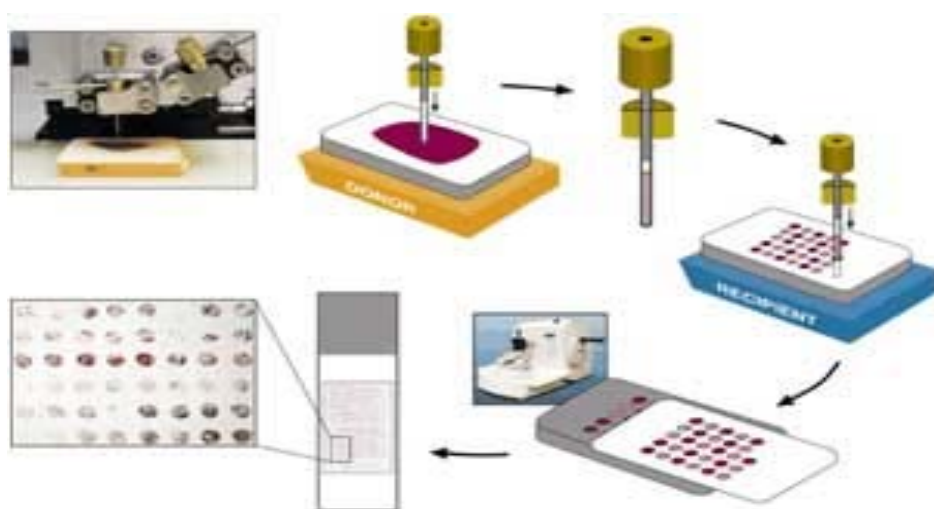
- Pacientes que apresentaram segundo tumor primário.
- Pacientes que tenham realizado tratamento adjuvante ou neo-adjuvante.

3.3 CONSTRUÇÃO DO “TISSUE MICROARRAY”

Os blocos de TMA foram construídos utilizando-se os casos com diagnóstico de carcinoma epidermóide de pênis, submetidos à cirurgia no Hospital A.C. Camargo no período entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000. Os casos foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia

Patológica e os blocos representativos foram separados e inclusos na construção de um bloco receptor.

O bloco receptor de parafina de TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), foi elaborado a partir de amostras colhidas dos blocos-doadores originais, com agulha de um milímetro de diâmetro (TM Arrayer punch MP10-1,0 mm), após escolha inicial e marcação de área representativa do tumor, a partir da lâmina de Hematoxilina e Eosina (H&E) original. Foram realizados punches em duplicata (dois cores de cada caso) do bloco de parafina doador, e inseridos no bloco de parafina receptor, obtendo-se, dessa forma, duas áreas diferentes do tumor em cada caso (Figura 4).



Fonte: GILTNANE e RIMM (2004)

Legenda: Cores de 1mm de diâmetro são perfurados a partir de blocos de parafina doadores com amostras representativas do tumor. Punches em duplicata são inseridos em bloco de parafina receptor e, posteriormente, são seccionados em micrôtomto de tal forma a gerarem matrizes a partir dos mesmos tecidos. Uma vez montadas em uma lâmina de vidro, essas matrizes podem ser imuno-coradas para se estudar a expressão de marcadores tumorais.

Figura 4 - Esquema ilustrativo da construção do TMA.

O TMA 1 compreendeu os casos de números 1 a 110; o TMA 2 compreendeu os casos de números 111 a 220; o TMA 3 compreendeu os casos de números 221 a 326 e, finalmente, o TMA 4 compreendeu os casos de números 327 a 384.

3.4 IMUNOISTOQUÍMICA

A partir dos 384 casos existentes, foram realizadas reações de imunoistoquímica, em duplicata, nos quatro blocos de arranjo tecidual em matriz, TMA já construídos previamente pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo com os respectivos materiais devidamente arquivados em parafina.

As lâminas selecionadas foram previamente tratadas com 3 aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, A-3648, USA) e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C para melhor adesão dos tecidos nas mesmas.

O método de imunoistoquímica aplicado seguiu o protocolo utilizado na rotina do Hospital A.C. Camargo e compreende os seguintes passos:

- Desparafinização: banham-se as lâminas de TMA em xilol por três vezes de cinco minutos cada; em seguida banham-se, rapidamente, as lâminas por quatro vezes em álcool absoluto e em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.

- Recuperação Antigênica: todos os anticorpos analisados foram padronizados utilizando-se solução de citrato (pH 6,0) e panela de pressão (Manttra[®]). Colocam-se as lâminas no borel com solução de citrato dentro da panela de pressão com um pouco de água destilada em seu interior marcando o tempo de 25 minutos. Depois de desligada a panela, retira-se o borel para esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.
- Bloqueio de proteína (peroxidase endógena): banham-se as lâminas com H₂O₂ (10 volumes) por três vezes de cinco minutos cada. Em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.
- Bloqueio de proteínas inespecíficas: utiliza-se o bloqueador de proteína Kit Dako[®] Protein serum-free. Secam-se as lâminas e circula-se o corte tecidual de cada uma delas com caneta de silicone; incubam-se 100 µl do bloqueador por 20 minutos em câmara úmida.
- Incubação com anticorpo primário: dilui-se cada anticorpo com o diluente da Dako[®] (Antibody Diluent with Background Reducing Component) de acordo com a proporção padronizada para cada um deles; incuba-se 100 µl do anticorpo diluído em cada lâmina “overnight” em câmara úmida; lavam-se as lâminas com piseta

contendo PBS 1X. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada.

- Incubação com o anticorpo secundário: todos os anticorpos foram padronizados para incubação com polímero. Incuba-se 100 µl do post primary block (Dako®) em cada lâmina por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada. Incuba-se, então, 100 µl do polímero (Dako®) em cada lâmina por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida lavam-se as lâminas em PBS por três vezes de cinco minutos cada.
- Coloração: dilui-se o reagente DAB na proporção 1:50; incuba-se 100 µl do DAB em cada lâmina por cinco minutos tomando-se o cuidado de retirá-lo antes do término do tempo caso o corte tecidual fique muito escuro; passam-se as lâminas rapidamente em água para retirar o DAB, colocando-as em água limpa dentro de um borel; em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos; incubam-se as lâminas em hematoxilina por dois minutos; lavam-se as lâminas em água para tirar o excesso da hematoxilina; passam-se, rapidamente, as lâminas pelo diferenciador (álcool 50% + ácido clorídrico). Em seguida lavam-se as lâminas em água corrente por cinco minutos.

- Montagem das lâminas: para a desidratação, banham-se, rapidamente, as lâminas por quatro vezes em álcool absoluto, uma vez em álcool absoluto + xilol e por três vezes em xilol; pinga-se sobre uma lamínula a cola de montagem (Entelan-Merk®), cobrindo-a com a lâmina.

Como os cortes de TMA são um pouco maiores que os cortes de tecidos comuns, substituíram-se os volumes de incubação de 100 µl por 200 µl.

Os anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas foram o CD44 (HCAM), Ezrina, Radixina e Moesina, com suas especificações ilustradas no Quadro 2.

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

Anticorpo	Clone	Fabricante	Controle Positivo	Diluição
CD44 (HCAM)	DF1485	Visionbiosystems Novocastra	Tonsila	1:40
Ezrina	3C12	Lab Vision Corporation	Pulmão	1:1000
Radixina	EP1862Y	Epitomics	Tumor de Ovário	1:1000
Moesina	38/87	Lab Vision Corporation	Placenta	1:400

3.5 MICROSCOPIA DIGITAL

Para a avaliação das expressões protéicas de CD44, Ezrina, Radixina e Moesina levaram-se em consideração a intensidade da reação, bem como a localização celular da proteína.

A análise foi realizada através de microscopia digital por meio do programa ACIS III (Automated Cellular Imaging System - DAKO[®], Santa Bárbara, Califórnia – Estados Unidos da América) (Figura 5). Este programa reconhece com rapidez e sensibilidade centenas de níveis de intensidade das reações imunoistoquímicas e as converte em uma escala de valores de intensidade de acordo com as colorações obtidas. O sistema permite o escaneamento das lâminas à baixa magnificação (x10), permite avaliar a área a ser estudada a mais alta magnificação (x40 ou x60) para excluir debris celulares, além de detectar, contar e classificar as células baseadas na cor, forma e tamanho das mesmas. A densidade óptica (DO) varia de 0 a 255.

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



Figura 5 - Ilustração da plataforma ACIS III (Automated Cellular Imaging System-DAKO®).

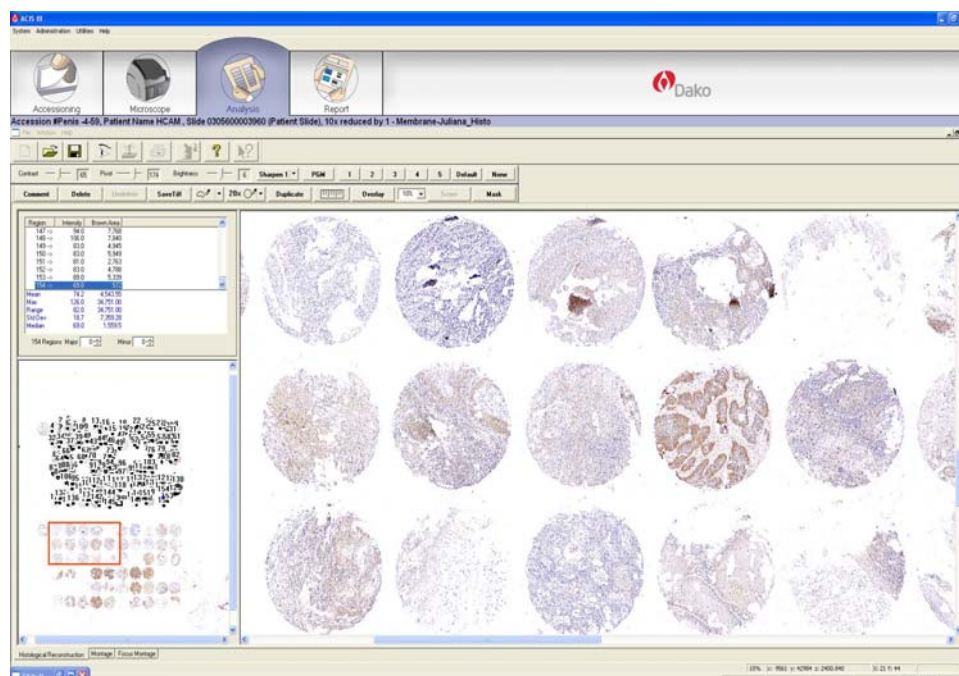


Figura 6 - Ilustração do monitor do computador acoplado ao sistema ACIS III com imagens escaneadas a serem analisadas.

As lâminas dos quatro blocos de TMA, cada uma em duplicata, com suas respectivas reações imunoistoquímicas, foram escaneadas pelo sistema ACIS III e digitalizadas num banco de imagens. Por meio de um monitor de computador (Figura 6) as imagens foram geradas e analisadas pelos autores, que selecionaram de uma a três áreas da amostra, conforme a região tumoral. O programa leu as áreas selecionadas e quantificou numericamente a intensidade de coloração dos anticorpos nestas áreas. A intensidade final da reação de cada caso foi calculada através da média das intensidades das reações das áreas selecionadas.

Tanto na análise de CD44 quanto na análise de Ezrina, estabeleceu-se arbitrariamente que valores de DO abaixo de 70 teriam expressão negativa, valores entre 70 e 85 teriam expressão fraca e valores acima de 85 teriam expressão forte.

Na análise de Moesina, estabeleceram-se valores de DO baseados na mediana das intensidades das reações de cada bloco de TMA. Dessa forma, no TMA 1, valores abaixo de 83.5 foram considerados como expressão fraca e valores acima deste número foram considerados como expressão forte; no TMA 2 houve discrepância nos valores de intensidade obtidos, o que inviabilizou a sua análise; no TMA 3, valores abaixo de 108 foram considerados como expressão fraca e valores acima deste número foram considerados como expressão forte; no TMA 4, valores abaixo de 94 foram considerados como expressão fraca e valores acima deste número foram considerados como expressão forte. Valores iguais a zero foram considerados negativos.

Na análise de Radixina, estabeleceu-se que valores de DO abaixo de 75 teriam expressão negativa e valores acima de 75 teriam expressão positiva.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações coletadas foram armazenadas num banco de dados informatizado e analisadas através do programa Statistical Package for Social Science – SPSS (versão 15.0).

As descrições da população e das variáveis do estudo foram realizadas por meio de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mediana e porcentagens). As variáveis biomoleculares CD44, Ezrina e Moesina foram categorizadas em negativa, expressão fraca e expressão forte. A variável Radixina foi categorizada em negativa e positiva.

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

Para o cálculo das probabilidades de sobrevida global (SG), considerou-se o intervalo de tempo transcorrido entre a data da cirurgia e a data do óbito ou do último seguimento. Para a sobrevida livre de doença (SLD), considerou-se o tempo transcorrido até a data da recorrência da doença. A estimativa da sobrevida livre de doença foi realizada apenas para os pacientes sem metástases linfonodais na admissão e aqueles cujas

margens cirúrgicas macroscópicas foram consideradas sem doença. As taxas de sobrevida foram calculadas pelo estimador produto limite de Kaplan-Méier, sendo as curvas comparadas pelo teste de Log-rank. As variáveis com nível descritivo do teste de até 0,200 e cujos riscos eram proporcionais ao longo do tempo foram selecionadas para a análise multivariada, a qual foi realizada pelo modelo de risco proporcional de Cox. Avaliou-se a proporcionalidade de riscos por meio de gráficos $\ln - \ln [S(t)]$.

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

4 RESULTADOS

Dos 384 casos selecionados para a análise imunoistoquímica, um total de 248 pacientes (64,58%) com carcinoma de pênis puderam ser avaliados quanto aos dados clínicos, epidemiológicos, anatomopatológicos e imunoistoquímicos.

4.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Os aspectos clínico-demográficos estão sumarizados na Tabela 1.

Os 248 pacientes foram categorizados, quanto à idade, em menores de 60 anos e maiores de 60 anos, idade esta considerada pelo Ministério da Saúde do Brasil e Organização Mundial da Saúde como definição para idosos em países em desenvolvimento.

Sendo assim, a idade variou entre 21 e 87 anos, com uma mediana de 54 anos. Um total de 165 pacientes (66,5%) foi categorizado como menor ou igual a 60 anos e um total de 83 pacientes (33,5%) foi categorizado como maior de 60 anos. Do total, a maioria era casada (73,0%) e da raça branca (74,6%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência das variáveis demográficas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Idade	≤ 60 anos	165	66,5
	> 60 anos	83	33,5
Raça	Branca	185	74,6
	Não Branca	63	25,4
Estado Civil	Solteiro	15	6,0
	Casado	181	73,0
	Separado	2	0,8
	Outros	18	7,3
	Ignorado	32	12,9

No momento da primeira consulta, 66,1% apresentaram os tumores intactos e 29,0% apresentaram os tumores biopsiados; 75,4% não apresentaram postectomia prévia. Apenas 153 pacientes (61,7%) souberam relatar a ocorrência de antecedentes venéreos, o que acometeu 64 (25,8%) destes pacientes. 125 pacientes (50,4%) tiveram mais de seis meses de evolução da doença antes da primeira consulta (Tabela 2).

De acordo com o Sistema TNM de estadiamento clínico, 28 (11,3%) pacientes apresentaram estadiamento T1, 115 (46,5%) pacientes apresentaram estadiamento T2, 93 (37,5%) pacientes apresentaram estadiamento T3 e 12 (4,8%) pacientes apresentaram estadiamento T4; 124 (50%) pacientes apresentaram estadiamento N0, 38 (15,3%) pacientes apresentaram estadiamento N1, 75 (30,2%) pacientes apresentaram estadiamento N2, seis (2,4%) apresentaram estadiamento N3 e cinco (2,0%) apresentaram estadiamento Nx (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência das variáveis clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Antecedentes Venéreos	Sem antecedentes	89	35,9
	Com antecedentes	64	25,8
	*	95	38,3
Postectomia	Não	187	75,4
	Sim	46	18,5
	*	15	6,1
Situação do Tumor na Primeira Consulta	Biopsiado	72	29,0
	Amputado	9	3,6
	Intacto	164	66,1
	*	3	1,2
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	114	46,0
	Mais de 6 meses	125	50,4
	*	9	3,6
Estadiamento T	T1	28	11,3
	T2	115	46,4
	T3	93	37,5
	T4	12	4,8
Estadiamento N	N0	124	50,0
	N1	38	15,3
	N2	75	30,2
	N3	6	2,4
	Nx	5	2,0

*Sem informação.

4.2 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Nos 248 pacientes avaliados, observou-se uma maior predominância de tumores bem diferenciados (42,7%), seguido de 39,5% de tumores com grau de diferenciação intermediário.

Com relação ao caráter infiltrativo, 71,8% dos tumores apresentaram infiltração de corpo esponjoso, 48,4% apresentaram infiltração de corpo cavernoso, 26,2% apresentaram infiltração de uretra e 1,6% apresentaram infiltração de órgãos adjacentes. Na maioria dos casos (63,3%) o tumor tinha

uma espessura maior do que 5mm, 25,0% apresentaram invasão angiolinfática e 31,5% apresentaram invasão perineural (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência das variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	42	16,9
	Grau intermediário	98	39,5
	Alto Grau	106	42,7
	*	2	0,8
Espessura do Tumor	Até 5 mm	67	27,0
	Maior que 5 mm	157	63,3
	*	24	9,7
Invasão Angiolinfática	Ausente	164	66,1
	Presente	62	25,0
	*	21	8,5
Invasão Perineural	Ausente	150	60,5
	Presente	78	31,5
	*	19	7,7
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	231	93,1
	Presente	4	1,6
	*	13	5,2
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	68	27,4
	Presente	120	48,4
	*	60	24,2
Infiltração de Uretra	Ausente	106	42,7
	Presente	65	26,2
	*	77	31,0
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	20	8,1
	Presente	178	71,8
	*	50	20,2
Alteração sugestiva de HPV	Ausente	231	93,1
	Presente	4	1,6
	*	13	5,2

*Sem informação.

4.3 ASPECTOS CIRÚRGICOS

De acordo com o tipo de cirurgia realizada, 56,9% dos pacientes realizaram amputação parcial do pênis e 35,9% realizaram a sua amputação

total. Apenas seis pacientes (2,4%) passaram por procedimento mais agressivo como a amputação interílioabdominal (Tabela 4).

Tabela 4 - Tipo de cirurgia realizada nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Tipo de Cirurgia	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Amputação Parcial	141	56,9
Amputação Total	89	35,9
Postectomia	1	0,4
Amputação Interílioabdominal	6	2,4
Sem informação	11	4,4
Total	248	100

Ainda em relação aos procedimentos cirúrgicos, 116 pacientes foram submetidos a algum tipo de esvaziamento linfonodal, sendo que 27 (10,9%) por medida profilática (esvaziamento de princípio) e 89 (35,9%) por medida terapêutica (esvaziamento de necessidade) (Tabela 5).

Tabela 5 - Intenção do esvaziamento linfonodal nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Intenção do Esvaziamento Linfonodal	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Princípio	27	10,9
Necessidade	89	35,9
Não esvaziaram	132	53,2
Total	248	100

Do total de pacientes submetidos à linfadenectomia, 40 (16,1%) foram submetidos ao esvaziamento inguinal e 76 (30,6%) foram submetidos ao esvaziamento inguinoilíaco (Tabela 6).

Tabela 6 - Tipo de esvaziamento linfonodal realizado nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Tipo de Esvaziamento Linfonodal	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Nenhum	132	53,2
Inguinal	40	16,1
Inguinoilíaco	76	30,6
Total	248	100

Ainda deste total, 32 pacientes (12,9%) submeteram-se à linfadenectomia unilateral e 27 pacientes (10,9%) submeteram-se às linfadenectomias bilaterais (Tabela 7).

Tabela 7 - Lateralidade da linfadenectomia nos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Lateralidade da Linfadenectomia	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Unilateral	32	12,9
Bilateral	27	10,9
Não submetidos à linfadenectomia	187	75,4
Sem informação	2	0,8
Total	248	100

Quanto à positividade ao exame anatomopatológico, 55 pacientes (22,2%) não apresentaram nenhum linfonodo positivo e 61 pacientes (24,6%) apresentaram ao menos um linfonodo positivo, com uma variação de 1 a 21 linfonodos positivos por paciente (Tabela 8).

Tabela 8 - Número de linfonodos positivos ao exame anatomopatológico nos 116 pacientes portadores de carcinoma de pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000, submetidos à linfadenectomia.

Número de linfonodos positivos	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Nenhum	55	22,2
1	17	6,9
2	17	6,9
3	9	3,6
4	6	2,4
5	6	2,4
6	3	1,2
9	1	0,4
15	1	0,4
21	1	0,4

4.4 ASPECTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Os dados de imunoistoquímica para a proteína CD44 e para as proteínas da família ERM (Ezrina, Radixina, Moesina) foram avaliados quanto à intensidade obtida pelo programa ACIS III (Automated Cellular Imaging System - DAKO®, Santa Bárbara, Califórnia – Estados Unidos da América), medida em densidade óptica.

Para CD44, os parâmetros da imunorreatividade foram categorizados em negativa, forte e fraca, conforme a intensidade da reação obtida. Sendo assim, a maioria dos casos (38,1%) apresentou expressão fraca e 26,7% apresentou expressão negativa.

Para Ezrina, os parâmetros utilizados para avaliar a imunorreatividade também foram categorizados em negativa, forte e fraca, conforme a intensidade da reação obtida, sendo que 54,0% dos casos apresentaram expressão negativa e 12,5% apresentaram expressão forte.

No caso de Moesina, os parâmetros da imunorreatividade categorizaram-se em negativa, forte e fraca, conforme a intensidade da reação obtida, sendo que 52,6% dos casos apresentaram expressão forte e 1,6% apresentaram expressão negativa.

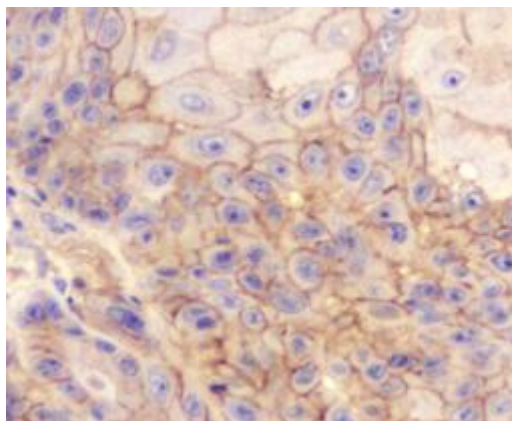
Já para Radixina, os parâmetros da imunorreatividade foram categorizados em positiva e negativa, conforme a intensidade da reação obtida e a maioria dos casos (56,0%) apresentou expressão negativa.

Tais dados podem ser analisados na tabela abaixo:

Tabela 9 - Imunorreatividade das proteínas estudadas de acordo com seus parâmetros obtidos nos 248 casos de pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

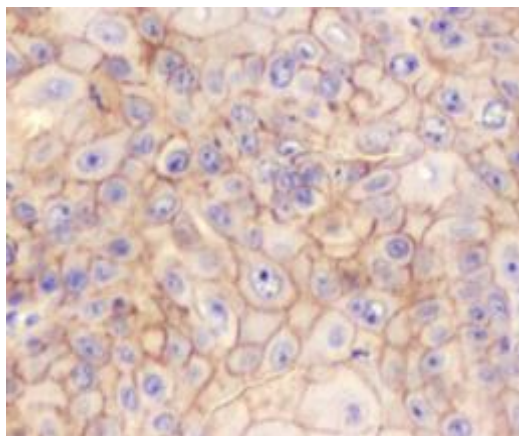
Parâmetro	CD44 (%)	Ezrina (%)	Radixina (%)	Moesina (%)
Negativa	26,7	54,0	56,0	1,6
Fraco	38,1	33,5	-	45,8
Forte	35,2	12,5	-	52,6
Positiva	-	-	44,0	-

As Figuras de 7 a 17 ilustram exemplos de imunorreatividades obtidas para CD44, Ezrina, Radixina e Moesina, respectivamente.



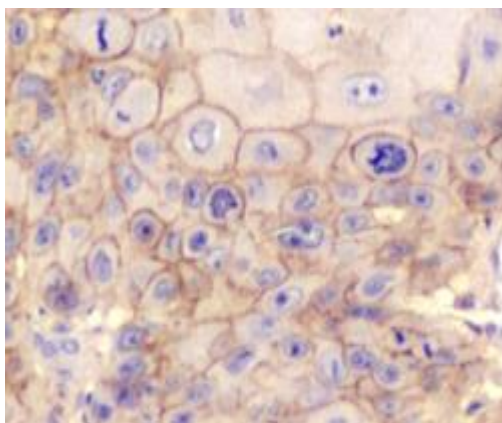
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 7 - Imunorreatividade forte obtida para CD44 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



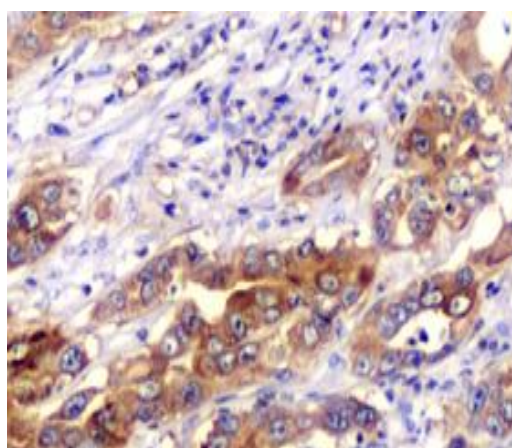
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 8 - Imunorreatividade fraca obtida para CD44 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



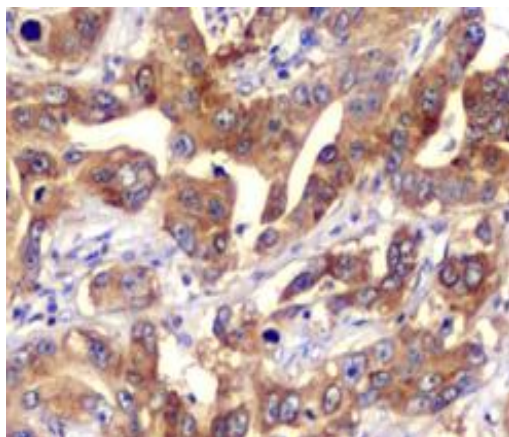
Legenda - Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 9 - Imunorreatividade negativa obtida para CD44 em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



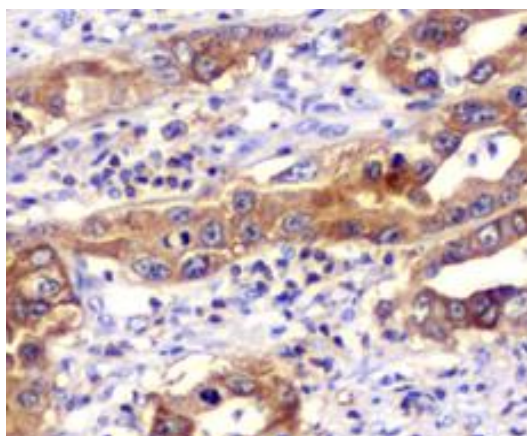
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 10 - Imunorreatividade forte obtida para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



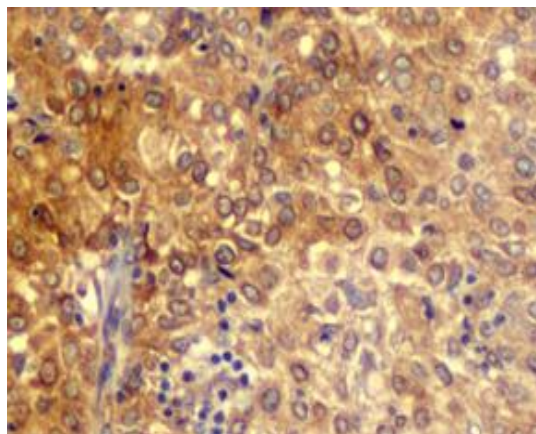
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 11 - Imunoreatividade fraca obtida para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



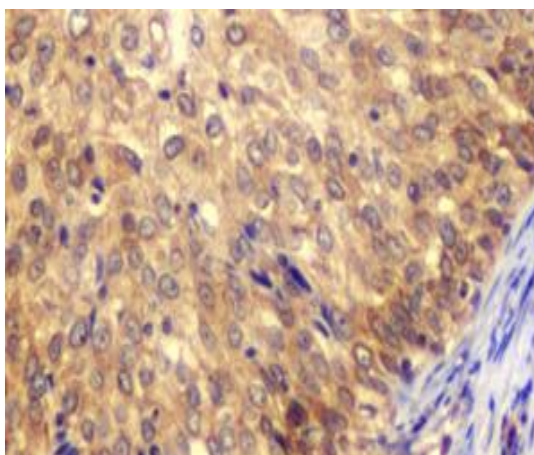
Legenda - Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 12 - Imunorreatividade negativa obtida para Ezrina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



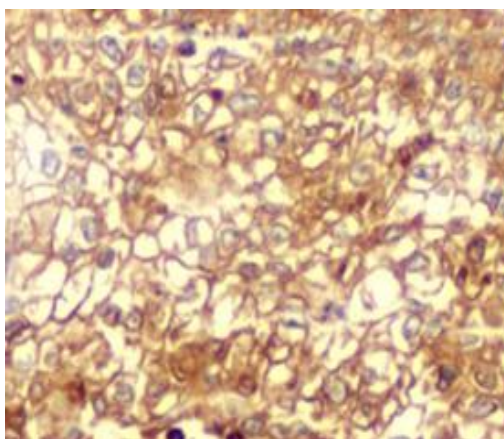
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 13 - Imunorreatividade positiva obtida para Radixina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



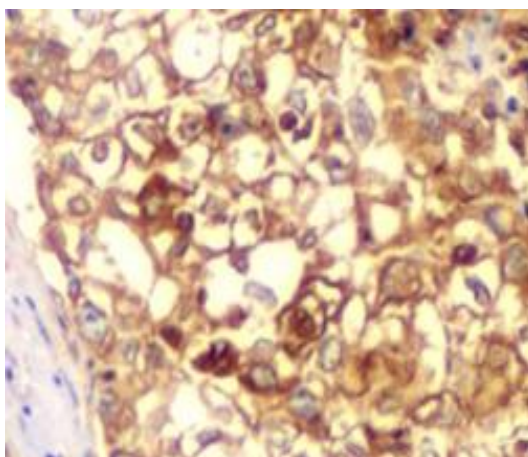
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 14 - Imunorreatividade negativa obtida para Radixina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



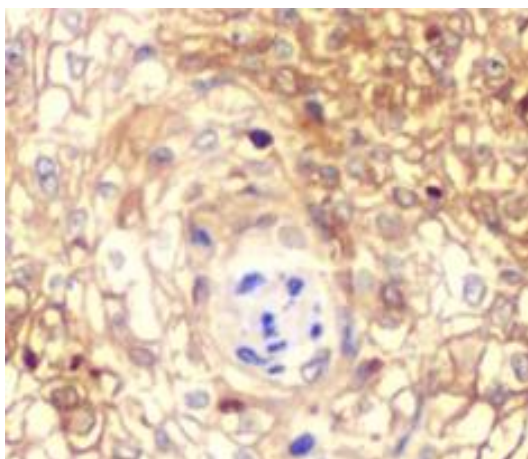
Legenda: Coloração H.E. Aumento de 400x.

Figura 15 - Imunorreatividade forte obtida para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



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

Figura 16 - Imunorreatividade fraca obtida para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.



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

Figura 17 - Imunorreatividade negativa obtida para Moesina em corte histológico de Carcinoma Epidermóide de Pênis.

A Tabela 10 mostra que CD44 não se associou significativamente com nenhuma das variáveis clínico-demográficas avaliadas, embora tenha demonstrado uma leve tendência em se associar inversamente com o estadiamento N ($p=0,091$).

Tabela 10 - Imunorreatividade de CD44 de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	CD44 (N)			CD44 (%)			P (x ²)
		FO	FR	N	FO	FR	N	
Idade	≤ 60 anos	53	70	41	64,6	72,9	59,4	0,178
	> 60 anos	29	26	28	35,4	27,1	40,6	
Raça	Branca	59	75	51	72,0	78,1	73,9	0,623
	Não Branca	23	21	18	28,0	21,9	26,1	
Postectomia	Não	56	75	55	74,7	83,3	82,1	0,476
	Sim	19	15	12	15,3	16,6	17,9	
Situação do Tumor na Primeira Consulta	Biopsiado	78	91	66	97,5	95,8	95,7	0,788
	Amputado	2	4	3	2,5	4,2	4,3	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	34	49	30	43,0	53,8	44,1	0,299
	Mais de 6 meses	45	42	38	57,0	46,2	55,9	
Estadiamento T	T1	9	12	7	11,0	12,5	10,1	0,625
	T2	40	45	29	48,8	46,9	42,0	
	T3	29	37	27	35,4	38,5	39,1	
	T4	4	2	6	4,9	2,1	8,7	
Estadiamento N	N0	46	51	27	56,1	53,1	39,1	0,091
	N1	13	10	15	15,9	10,4	21,7	
	N2	22	28	24	26,8	29,2	34,8	
	N3	0	3	3	0,0	3,1	4,3	
	Nx	1	4	0	1,2	4,2	0,0	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco.

Já em relação às variáveis anatomopatológicas, a imunorreatividade para CD44 mostrou-se inversamente significativa para a invasão perineural ($p=0,048$) e para a infiltração de corpo cavernoso ($p=0,007$), além de mostrar uma leve tendência em se associar significativamente com a infiltração de corpo esponjoso ($p=0,098$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Imunorreatividade de CD44 de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	CD44 (N)			CD44 (%)			P (χ^2)
		FO	FR	N	FO	FR	N	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	15	18	9	18,3	18,9	13,2	0,847
	Grau	30	38	29	36,6	40,0	42,6	
	Intermediário							
	Alto Grau	37	39	30	45,1	41,1	44,1	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	25	24	18	32,5	27,6	30,0	0,793
	Maior que 5mm	52	63	42	67,5	72,4	70,0	
Invasão Angiolinfática	Ausente	61	62	41	74,4	72,1	70,7	0,883
	Presente	21	24	17	25,6	27,9	29,3	
Invasão Perineural	Ausente	62	54	34	75,6	62,8	56,7	0,048
	Presente	20	32	26	24,4	37,2	43,3	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	76	91	63	98,7	98,9	96,9	0,603
	Presente	1	1	2	1,3	1,1	3,1	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	33	24	11	47,8	37,5	20,4	0,007
	Presente	36	40	43	52,2	62,5	79,6	
Infiltração de Uretra	Ausente	39	41	25	66,1	65,1	52,1	0,263
	Presente	20	22	23	33,9	34,9	47,9	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	7	11	2	9,5	15,5	3,8	0,098
	Presente	67	60	51	90,5	84,5	96,2	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco.

Dentre as variáveis clínico-demográficas, a imunorreatividade para Ezrina mostrou-se significativamente associada à postectomia ($p=0,014$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Ezrina (N)			Ezrina (%)			P (χ^2)
		FO	FR	N	FO	FR	N	
Idade	≤ 60 anos	23	60	82	69,7	71,4	62,6	0,374
	> 60 anos	10	24	49	30,3	28,6	37,4	
Raça	Branca	28	61	96	84,8	72,6	73,3	0,346
	Não Branca	5	23	35	15,2	27,4	26,7	
Postectomia	Não	18	63	106	64,3	77,8	85,5	0,014
	Sim	10	18	18	35,8	22,2	14,5	
Situação do Tumor na Primeira Consulta	Biopsiado	32	77	127	97,0	93,9	97,7	0,352
	Amputado	1	5	3	3,0	6,1	2,3	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	13	41	60	40,6	50,6	47,6	0,632
	Mais de 6 meses	19	40	66	59,4	49,4	52,4	
Estadiamento T	T1	5	10	13	15,2	11,9	9,9	0,630
	T2	15	42	58	45,5	50,0	44,3	
	T3	13	29	51	39,4	34,5	38,9	
	T4	0	3	9	0,0	3,6	6,9	
Estadiamento N	N0	17	43	64	51,5	51,2	48,9	0,732
	N1	4	12	22	12,1	14,3	16,8	
	N2	11	25	39	33,3	29,8	29,8	
	N3	0	1	5	0,0	1,2	3,8	
	Nx	1	3	1	3,0	3,6	0,8	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco.

Das variáveis anatomopatológicas, apenas o grau de diferenciação ($p=0,001$) mostrou-se significativamente associado a imunorreatividade de Ezrina (Tabela 13).

Tabela 13 - Imunorreatividade de Ezrina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Ezrina (N)			Ezrina (%)			P (χ^2)
		FO	FR	N	FO	FR	N	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	5	8	29	15,2	9,5	22,5	0,001
	Grau Intermediário	6	33	59	18,2	39,3	45,7	
	Alto Grau	22	43	41	66,7	51,2	31,8	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	8	23	36	24,2	30,3	31,3	0,735
	Maior que 5mm	25	53	79	75,83	69,7	68,7	
Invasão Angiolinfática	Ausente	21	57	86	63,6	73,1	74,8	0,446
	Presente	12	21	29	36,4	26,9	25,20	
Invasão Perineural	Ausente	21	57	72	63,6	72,2	62,1	0,332
	Presente	12	22	44	36,4	27,8	37,9	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	28	80	123	100,0	98,8	97,6	0,626
	Presente	0	1	3	0,0	1,2	2,4	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	13	28	27	43,3	41,8	29,7	0,197
	Presente	17	39	64	56,7	58,2	70,3	
Infiltração de Uretra	Ausente	15	39	52	60,0	62,9	61,9	0,968
	Presente	10	23	32	40,0	37,1	38,1	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	2	10	8	7,1	13,3	8,4	0,490
	Presente	26	65	87	92,9	86,7	91,6	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco.

Para Radixina não houve nenhuma associação significativa com as variáveis clínicas e demográficas, embora a idade tenha demonstrado uma correlação praticamente significativa ($p=0,050$), conforme ilustrado na tabela abaixo:

Tabela 14 - Imunorreatividade de Radixina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Radixina (N)		Radixina (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Idade	≤ 60 anos	103	62	71,5	59,6	0,050
	> 60 anos	41	42	28,5	40,4	
Raça	Branca	109	76	75,7	73,1	0,640
	Não Branca	35	28	24,3	26,9	
Postectomia	Não	114	73	83,2	76,0	0,379
	Sim	23	23	16,8	24,0	
Situação do Tumor na Primeira Consulta	Biopsiado	136	100	95,8	97,1	0,590
	Amputado	6	3	4,2	2,9	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	66	48	47,1	48,5	0,838
	Mais de 6 meses	74	51	52,9	51,5	
Estadiamento T	T1	15	13	10,4	12,5	0,874
	T2	68	47	47,2	45,2	
	T3	53	40	36,8	38,5	
	T4	8	4	5,6	3,8	
Estadiamento N	N0	68	56	47,2	53,8	0,117
	N1	19	19	13,2	18,3	
	N2	47	28	32,6	26,9	
	N3	5	1	3,5	1,0	
	Nx	5	0	3,5	0,0	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - P-positivo; N-negativo.

Para as variáveis anatomopatológicas, a invasão de órgãos adjacentes ($p=0,094$) e a infiltração de corpo cavernoso ($p=0,081$) mostraram uma tendência em se associar significativamente com a Radixina como ilustrado na Tabela 15.

Tabela 15 - Imunorreatividade de Radixina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Radixina (N)		Radixina (%)		P (χ^2)
		N	P	N	P	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	22	20	15,4	19,4	0,674
	Grau Intermediário	57	41	39,9	39,8	
	Alto Grau	64	42	44,8	40,8	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	37	30	28,2	32,3	0,518
	Maior que 5mm	94	63	71,8	67,7	
Invasão Angiolinfática	Ausente	93	71	71,0	74,7	0,533
	Presente	38	24	29,0	25,3	
Invasão Perineural	Ausente	82	68	62,1	70,8	0,171
	Presente	50	28	37,9	29,2	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	135	96	97,1	100,0	0,094
	Presente	4	0	2,9	0,0	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	36	32	31,3	43,8	0,081
	Presente	79	41	68,7	56,2	
Infiltração de Uretra	Ausente	67	39	62,6	60,9	0,827
	Presente	40	25	37,4	39,1	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	11	9	9,7	10,6	0,844
	Presente	102	76	90,3	89,4	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - P-positivo; N-negativo.

Com relação às variáveis clínicas e demográficas, a proteína Moesina mostrou-se significativamente associada à raça ($p=0,030$) e à postectomia ($p=0,001$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Moesina (N)			Moesina (%)			P (χ^2)
		FO	FR	N	FO	FR	N	
Idade	≤ 60 anos	66	59	3	70,2	68,6	100,0	0,505
	> 60 anos	28	27	0	29,8	31,4	0,0	
Raça	Branca	67	72	1	71,3	83,7	33,3	0,030
	Não Branca	27	14	2	28,7	16,3	66,7	
Postectomia	Não	71	62	0	83,5	76,5	0,0	0,001
	Sim	14	19	3	16,5	23,4	100,0	
Situação do Tumor na Primeira Consulta	Biopsiado	86	82	3	94,5	95,3	100,0	0,893
	Amputado	5	4	0	5,5	4,7	0,0	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	41	39	2	47,1	46,4	66,7	0,788
	Mais de 6 meses	46	45	1	52,9	53,6	33,3	
Estadiamento T	T1	10	11	1	10,6	12,8	33,3	0,834
	T2	38	40	1	40,4	46,5	33,3	
	T3	42	31	1	44,7	36,0	33,3	
	T4	4	4	0	4,3	4,7	0,0	
Estadiamento N	N0	44	43	1	46,8	50,0	33,3	0,980
	N1	14	10	1	14,9	11,6	33,3	
	N2	31	28	1	33,0	32,6	33,3	
	N3	2	3	0	2,1	3,5	0,0	
	Nx	3	2	0	3,2	2,3	0,0	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco.

Já para as variáveis anatomopatológicas não houve nenhuma associação significativa com Moesina (Tabela 17).

Tabela 17 - Imunorreatividade de Moesina de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Moesina (N)			Moesina (%)			P (χ^2)
		FO	FR	N	FO	FR	N	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	15	13	0	16,1	15,1	0,0	0,250
	Grau Intermediário	27	37	2	29,0	43,0	66,7	
	Alto Grau	51	36	1	54,8	41,9	33,3	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	25	20	1	29,1	25,6	50,0	0,690
	Maior que 5mm	61	58	1	70,9	74,4	50,0	
Invasão Angiolinfática	Ausente	66	53	2	75,0	67,1	100,0	0,353
	Presente	22	26	0	25,0	32,9	0,0	
Invasão Perineural	Ausente	54	56	1	61,4	70,0	50,0	0,452
	Presente	34	24	1	38,6	30,0	50,0	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	87	78	3	97,8	97,5	100,0	0,959
	Presente	2	2	0	2,2	2,5	0,0	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	24	24	1	32,0	38,1	33,3	0,754
	Presente	51	39	2	68,0	61,9	66,7	
Infiltração de Uretra	Ausente	37	44	2	54,4	71,0	66,7	0,149
	Presente	31	18	1	45,6	29,0	33,3	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	6	9	1	7,9	13,6	33,3	0,254
	Presente	70	57	2	92,1	86,4	66,7	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco.

4.5 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASE LINFONODAL

a. Análise Univariada

Dentre as variáveis clínico-demográficas estudadas, tiveram associação com a presença de metástase linfonodal, na análise univariada,

o estadiamento clínico T ($p=0,036$) e o estadiamento clínico N ($p=0,000$), conforme ilustrado na Tabela 18.

Tabela 18 - Status linfonodal de acordo com as variáveis demográficas e clínicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Número de Linfonodos		Porcentagem de Linfonodos (%)		p (X^2)
		Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	
Idade	≤ 60 anos	122	43	65,2	70,5	0,450
	> 60 anos	65	18	34,8	29,5	
Raça	Branca	137	48	73,3	78,7	0,398
	Não Branca	50	13	26,7	21,3	
Antecedentes Venéreos	Com Antecedentes	50	14	44,2	35,0	0,308
	Sem Antecedentes	63	26	55,8	65,0	
Postectomia	Não	137	50	78,3	86,2	0,189
	Sim	38	8	21,7	13,8	
Situação do Tumor na Primeira Consulta	Biopsiado	57	15	31,0	24,6	0,572
	Amputado	5	4	2,7	6,6	
	Intacto	122	42	66,3	68,8	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	88	26	48,9	44,1	0,520
	Mais de 6 meses	92	33	51,1	55,9	
Estadiamento T	T1	26	2	13,9	3,3	0,036
	T2	90	25	48,1	41,0	
	T3	63	30	33,7	49,2	
	T4	8	4	4,3	6,6	
Estadiamento N	N0	118	6	63,1	9,8	0,000
	N1	22	16	11,8	26,2	
	N2	41	34	21,9	55,7	
	N3	2	4	1,1	6,6	
	Nx	4	1	2,1	1,6	

*Foram considerados apenas os casos válidos.

Das variáveis anatomopatológicas, o grau de diferenciação ($p=0,002$), a invasão angiolinfática ($p<0,001$), a invasão perineural ($p<0,001$), a infiltração do corpo cavernoso ($p=0,008$) e a infiltração de uretra ($p=0,002$) tiveram associação significativa com a presença de metástases linfonodais, na análise univariada (Tabela 19).

Tabela 19 - Status linfonodal de acordo com as variáveis anatomopatológicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Número de Linfonodos		Porcentagem de Linfonodos (%)		p (χ^2)
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	40	2	21,6	3,3	0,002
	Grau Intermediário	74	24	40,0	39,3	
	Alto Grau	71	35	38,4	57,4	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	54	13	32,9	21,7	0,103
	Maior que 5mm	110	47	61,7	78,3	
Invasão Angiolinfática	Ausente	131	33	78,9	55,0	0,000
	Presente	35	27	21,1	45,0	
Invasão Perineural	Ausente	132	18	79,0	29,5	0,000
	Presente	35	43	21,0	70,5	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	172	59	98,3	98,3	0,980
	Presente	3	1	1,7	1,7	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	57	11	41,9	21,2	0,008
	Presente	79	41	58,1	78,8	
Infiltração de Uretra	Ausente	88	18	68,8	41,9	0,002
	Presente	40	25	31,2	58,1	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	18	2	12,2	4,0	0,098
	Presente	130	48	87,8	96,0	
Alteração sugestiva de HPV	Ausente	24	20	45,3	46,5	0,904
	Presente	29	23	54,7	53,5	

*Foram considerados apenas os casos válidos.

Não houve nenhuma associação significativa entre as variáveis imunoistoquímicas e a presença de metástases linfonodais na análise univariada (Tabela 20).

Tabela 20 - Status linfonodal de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Número de Linfonodos		Porcentagem de Linfonodos (%)		p (X ²)
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	
CD44	FO	63	19	33,9	31,1	0,807
	FR	73	23	39,2	37,7	
	N	50	19	26,9	31,1	
Ezrina	FO	25	8	13,4	13,1	0,994
	FR	63	21	33,7	34,4	
	N	99	32	52,9	52,5	
Radixina	N	107	37	57,2	60,7	0,637
	P	80	24	42,8	39,3	
Moesina	FO	67	27	48,2	61,4	0,264
	FR	70	16	50,4	36,4	
	N	2	1	1,4	2,3	

*Foram considerados apenas os casos válidos. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco; P-positivo; N-negativo.

b. Análise Multivariada

A lista com as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada, assim como as variáveis que atingiram valores de p até 0,200 são apresentadas na Tabela 21, em ordem de entrada, para avaliação multivariada.

Tabela 21 - Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Risco de Metástase Linfonodal. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.

Variável	P (χ^2)
Estadiamento Clínico N	<0,001
Invasão Angiolinfática	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Grau de Diferenciação	0,002
Infiltração de Uretra	0,002
Infiltração de Corpo Cavernoso	0,008
Estadiamento Clínico T	0,036
Infiltração de Corpo Esponjoso	0,098
Espessura do Tumor	0,103
Postectomia	0,189

No modelo multivariado foram levadas em consideração todas as variáveis listadas, com exceção do estadiamento clínico N. Dessa forma, a invasão angiolinfática (RR = 2,08; IC 95% [1,01 – 4,30]), invasão perineural (RR = 8,48; IC 95% [4,22 – 17,04]) e o grau de diferenciação histológica tumoral (RR = 6,18; IC 95% [1,33 – 28,76]) foram os fatores independentes de risco para comprometimento metastático dos linfonodos.

4.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.6.1 Sobrevida Câncer Específica

a. Análise Univariada

A taxa de Sobrevida Câncer Específica para a população estudada foi de 81,3% em cinco anos (60 meses) e 79,1% em 10 anos (120 meses), conforme mostra a Figura abaixo:

SOBREVIDA CÂNCER ESPECÍFICA

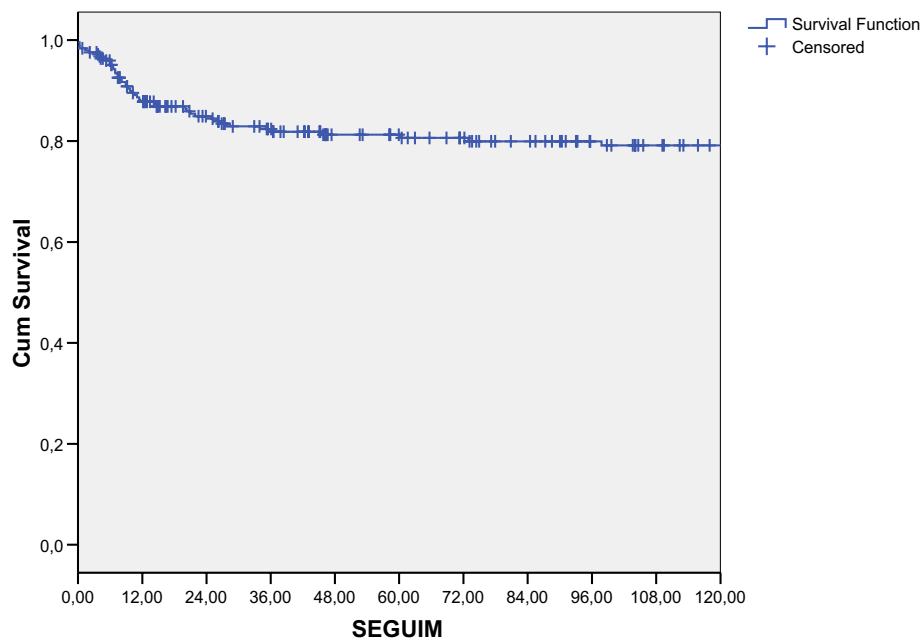


Figura 18 - Curva de Sobrevida Câncer Específica para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Dentre as variáveis clínico-demográficas, as que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica foram o estadiamento clínico N ($p < 0,001$) e a intenção do esvaziamento linfonodal ($p = 0,029$) (Tabela 22).

Tabela 22 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica, em cinco anos, de acordo com variáveis clínico-demográficas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos (%)	P (log rank)
Idade	≤ 60 anos	82,8	0,355
	> 60 anos	78,1	
Raça	Branca	80,5	0,838
	Não Branca	83,6	
Antecedentes Venéreos	Com Antecedentes	87,8	0,310
	Sem Antecedentes	83,1	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	79,4	0,844
	Mais de 6 meses	84,4	
Estadiamento T	T1	92,4	0,215
	T2	83,6	
	T3	77,5	
	T4	64,3	
Estadiamento N	N0	89,6	0,000
	N1	78,5	
	N2	74,8	
	N3	16,7	
	Nx	60,0	
Intenção do Esvaziamento Linfonodal	Princípio	88,9	0,029
	Necessidade	66,3	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Já com relação às variáveis anatomopatológicas, as que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica foram - grau de diferenciação ($p=0,002$), espessura do tumor ($p=0,005$), invasão angiolinfática ($p=0,021$), invasão perineural ($p<0,001$) e metástase linfonodal ($p=0,001$) (Tabela 23).

Tabela 23 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica, em cinco anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos (%)	P (log rank)
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	94,8	0,002
	Grau Intermediário	85,6	
	Alto Grau	71,2	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	90,1	0,005
	Maior que 5 mm	75,6	
Invasão Angiolinfática	Ausente	85,9	0,021
	Presente	70,7	
Invasão Perineural	Ausente	88,7	0,000
	Presente	66,3	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	80,8	0,852
	Presente	66,7	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	83,9	0,341
	Presente	78,4	
Infiltração de Uretra	Ausente	84,3	0,438
	Presente	77,1	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	84,4	0,869
	Presente	83,3	
Alteração sugestiva de HPV	Ausente	75,9	0,314
	Presente	81,1	
Metástase Linfonodal	Ausente	89,6	0,001
	Presente	72,6	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Não houve influência significativa da sobrevida câncer específica com as variáveis imunoistoquímicas (Tabela 24).

Tabela 24 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Câncer Específica, em cinco anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Câncer Específica em 5 anos (%)	P (log rank)
CD44	FO	79,5	0,387
	FR	84,5	
	N	78,5	
Ezrina	FO	82,7	0,430
	FR	76,6	
	N	83,4	
Radixina	N	78,5	0,506
	P	85,2	
Moesina	FO	78,7	0,836
	FR	78,9	
	N	-	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco; P-positivo; N-negativo.

b. Análise Multivariada

A lista com as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada, assim como as variáveis que atingiram valores de p até 0,200 estão apresentadas na Tabela 25, em ordem de entrada para avaliação multivariada.

Tabela 25 - Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Sobrevida Câncer Específica. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.

Variável	P (log rank)
Estadiamento Clínico N	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Metástase Linfonodal	0,001
Grau de Diferenciação	0,002
Espessura do Tumor	0,005
Invasão Angiolinfática	0,021
Intenção do Esvaziamento Linfonodal	0,029

No modelo multivariado foram levadas em consideração todas as variáveis listadas, com exceção do estadiamento clínico N. Assim, a metástase linfonodal (RR = 2,14; IC 95% [1,05 – 4,37]), a invasão perineural (RR = 2,78; IC 95% [1,44 – 5,38]) e a espessura do tumor (RR = 3,24; IC 95% [1,14 – 9,20]) foram os fatores independentes de risco para a sobrevida câncer específica, sem metástase linfonodal.

4.6.2 Sobrevida Livre de Doença

a. Análise Univariada

A taxa de sobrevida livre de doença para a população estudada foi de 74,7% em cinco anos (60 meses) e de 73,1% em 10 anos (120 meses), conforme ilustra a Figura abaixo:

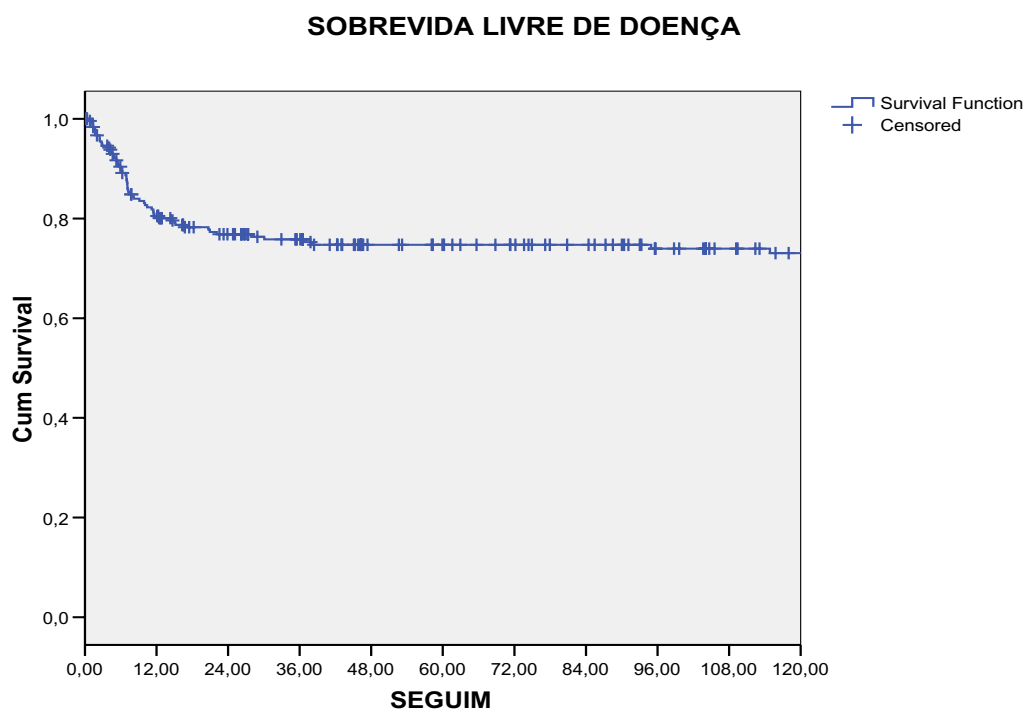


Figura 19 - Curva de Sobrevida Livre de Doença para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Dentre as variáveis clínico-demográficas que influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença estão o estadiamento clínico T ($p=0,029$), o estadiamento clínico N ($p<0,001$) e a intenção do esvaziamento linfonodal ($p=0,001$) (Tabela 26).

Tabela 26 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença, em cinco anos, de acordo com variáveis clínico-demográficas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Livre de Doença em 5 anos (%)	P (log rank)
Idade	≤ 60 anos	72,9	0,318
	> 60 anos	78,0	
Raça	Branca	73,0	0,448
	Não Branca	80,3	
Antecedentes Venéreos	Com Antecedentes	76,7	0,274
	Sem Antecedentes	69,7	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	69,4	0,244
	Mais de 6 meses	78,5	
Estadiamento T	T1	92,4	0,029
	T2	80,3	
	T3	65,0	
	T4	57,1	
Estadiamento N	N0	87,1	0,000
	N1	65,3	
	N2	62,7	
	N3	33,3	
	Nx	60,0	
Intenção do Esvaziamento Linfonodal	Princípio	96,0	0,001
	Necessidade	58,3	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Analisando-se as variáveis anatomopatológicas, as que influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença foram - o grau de diferenciação ($p=0,001$), a espessura do tumor ($p<0,001$), a invasão angiolinfática ($p=0,031$), a infiltração de uretra ($p=0,021$) e a metástase linfonodal ($p<0,001$). (Tabela 27)

Tabela 27 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença, em cinco anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Livre de Doença em 5 anos (%)	P (log rank)
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	97,5	0,001
	Grau Intermediário	76,0	
	Alto Grau	64,9	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	90,0	0,000
	Maior que 5 mm	67,6	
Invasão Angiolinfática	Ausente	78,6	0,031
	Presente	64,5	
Invasão Perineural	Ausente	84,2	0,000
	Presente	54,8	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	74,7	0,853
	Presente	75,0	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	81,0	0,155
	Presente	69,4	
Infiltração de Uretra	Ausente	82,6	0,021
	Presente	63,5	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	83,6	0,740
	Presente	74,3	
Alteração sugestiva de HPV	Ausente	73,1	0,917
	Presente	72,7	
Metástase Linfonodal	Ausente	87,1	0,000
	Presente	62,0	

*Foram excluídos os casos sem informação.

A Tabela 28 mostra que o marcador Ezrina ($p=0,025$) influenciou significativamente a sobrevida livre de doença.

Tabela 28 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Livre de Doença, em cinco anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Livre de Doença em 5 anos (%)	P (log rank)
CD44	FO	72,6	0,603
	FR	79,1	
	N	72,1	
Ezrina	FO	62,5	0,025
	FR	72,2	
	N	79,6	
Radixina	N	72,6	0,491
	P	77,6	
Moesina	FO	73,3	0,769
	FR	74,9	
	N	66,7	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco; P-positivo; N-negativo.

b. Análise Multivariada

A lista com as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada, assim como as variáveis que atingiram valores de p até 0,200 são apresentadas na Tabela 29, em ordem de entrada para avaliação multivariada.

Tabela 29 - Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Sobrevida Livre de Doença. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.

Variável	P (log rank)
Estadiamento Clínico N	<0,001
Espessura do Tumor	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Metástase Linfonodal	<0,001
Intenção do Esvaziamento Linfonodal	0,001
Grau de Diferenciação	0,001
Infiltração de Uretra	0,021
Ezrina	0,025
Estadiamento Clínico T	0,029
Invasão Angiolinfática	0,031
Infiltração de Corpo Cavernoso	0,155

***Legenda** - FO-forte; FR-fraco; P-positivo; N-negativo.

No modelo multivariado foram levadas em consideração todas as variáveis listadas, com exceção do estadiamento clínico N. A espessura (RR = 3,89; IC 95% [1,66 – 9,10]) e o grau de diferenciação histológico do tumor (RR = 9,00; IC 95% [1,23 – 65,63]) foram os fatores independentes de risco para óbito.

4.6.3 Sobrevida Global

a. Análise Univariada

A taxa de sobrevida global para a população estudada foi de 71,3% em cinco anos (60 meses) e de 56,0% em 10 anos (120 meses), conforme ilustra a Figura abaixo:

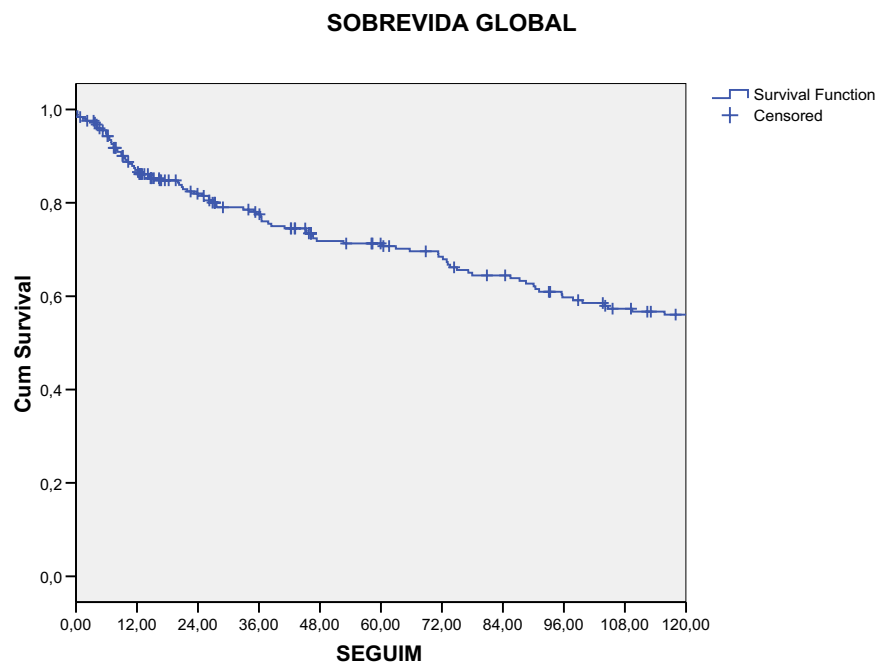


Figura 20 - Curva de Sobrevida Global para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Dentre as variáveis clínico-demográficas que influenciaram significativamente a sobrevida global estão a idade ($p < 0,001$) e o estadiamento clínico N ($p < 0,001$) (Tabela 30).

Tabela 30 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global, em cinco anos, de acordo com variáveis clínico-demográficas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Global em 5 anos (%)	P (log rank)
Idade	≤ 60 anos	77,6	0,000
	> 60 anos	59,5	
Raça	Branca	69,5	0,165
	Não Branca	77,1	
Antecedentes Venéreos	Com Antecedentes	76,2	0,509
	Sem Antecedentes	73,5	
Tempo de Evolução da Doença Antes da Primeira Consulta	Até 6 meses	70,9	0,337
	Mais de 6 meses	73,2	
Estadiamento T	T1	92,4	0,063
	T2	73,4	
	T3	64,8	
	T4	64,3	
Estadiamento N	N0	79,5	0,000
	N1	66,3	
	N2	64,6	
	N3	16,7	
	Nx	60,0	
Intenção do Esvaziamento Linfonodal	Princípio	80,9	0,238
	Necessidade	54,2	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Analisando-se as variáveis anatomopatológicas, as que influenciaram significativamente a sobrevida global foram - grau de diferenciação ($p=0,015$), espessura do tumor ($p=0,044$), invasão angiolinfática ($p=0,047$), invasão perineural ($p<0,001$) e metástase linfonodal ($p=0,001$) (Tabela 31).

Tabela 31 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global, em cinco anos, de acordo com variáveis anatomopatológicas para os 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Global em 5 anos (%)	P (log rank)
Grau de Diferenciação	Baixo Grau	92,0	0,015
	Grau Intermediário	69,5	
	Alto Grau	64,0	
Espessura do Tumor	Até 5 mm	80,6	0,044
	Maior que 5 mm	66,2	
Invasão Angiolinfática	Ausente	77,4	0,047
	Presente	54,7	
Invasão Perineural	Ausente	76,9	0,000
	Presente	59,6	
Invasão de Órgãos Adjacentes	Ausente	70,0	0,961
	Presente	66,7	
Infiltração de Corpo Cavernoso	Ausente	79,1	0,167
	Presente	65,7	
Infiltração de Uretra	Ausente	76,2	0,184
	Presente	63,3	
Infiltração de Corpo Esponjoso	Ausente	84,4	0,171
	Presente	73,6	
Alteração sugestiva de HPV	Ausente	65,0	0,747
	Presente	70,1	
Metástase Linfonodal	Ausente	79,5	0,001
	Presente	62,5	

*Foram excluídos os casos sem informação.

Conforme ilustrado na Tabela 32, nenhuma variável imunoistoquímica influenciou significativamente a sobrevida global.

Tabela 32 - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global, em cinco anos, de acordo com as variáveis imunoistoquímicas dos 248 pacientes portadores de Carcinoma de Pênis do Hospital A.C. Camargo entre Janeiro de 1953 a Dezembro de 2000.

Variável	Categoria	Sobrevida Global em 5 anos (%)	P (log rank)
CD44	FO	69,6	0,230
	FR	71,9	
	N	72,2	
Ezrina	FO	82,7	0,470
	FR	65,6	
	N	72,2	
Radixina	N	68,1	0,397
	P	76,0	
Moesina	FO	72,6	0,661
	FR	66,9	
	N	0,0	

*Foram excluídos os casos sem informação. **Legenda** - FO-forte; FR-fraco; P-positivo; N-negativo.

b. Análise Multivariada

A lista com as variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada, assim como as variáveis que atingiram valores de p até 0,200 são apresentadas na Tabela 33, em ordem de entrada para avaliação multivariada.

Tabela 33 - Lista das variáveis, por ordem de entrada, na análise multivariada, para Sobrevida Global. Considerando-se habilitados para análise valores de p até 0,200.

Variável	P (log rank)
Idade	<0,001
Estadiamento Clínico N	<0,001
Invasão Perineural	<0,001
Metástase Linfonodal	0,001
Grau de Diferenciação	0,015
Espessura do Tumor	0,044
Invasão Angiolinfática	0,047
Estadiamento Clínico T	0,063
Raça	0,165
Infiltração de Corpo Cavernoso	0,167
Infiltração de Corpo Esponjoso	0,171
Infiltração de Uretra	0,184

No modelo multivariado foram levadas em consideração todas as variáveis listadas, com exceção do estadiamento clínico N. Dessa forma, a idade (RR = 2,46; IC 95% [1,64 – 3,68]), a invasão perineural (RR = 1,58; IC 95% [1,02 - 2,46]), a metástase linfonodal (RR = 1,59; IC 95% [1,01 – 2,50]) e o grau de diferenciação histológico do tumor (RR = 1,81; IC 95% [1,02 – 3,21]) foram os fatores independentes de risco para óbito.

5 DISCUSSÃO

A descrição da biologia molecular do carcinoma peniano é rara na literatura, porém, alguns estudos, como os conduzidos pelo grupo do Hospital A.C. Camargo (VILLA e LOPES 1986; LOPES et al. 2002; GUIMARÃES et al. 2006b; CAMPOS et al. 2006), demonstraram a importância dos marcadores moleculares no entendimento da patologia, uma vez que alguns deles se correlacionaram significativamente com o estágio tumoral, a profundidade da invasão e o tipo histológico do tumor.

Estudos com a proteína p53 mostraram a sua importância no prognóstico dos pacientes com carcinoma epidermóide de pênis, já que sua expressão positiva relacionou-se significativamente com a presença de metástase linfonodal, melhor sobrevida global, o estágio tumoral, o grau histológico do tumor e a baixa sobrevida câncer específica (LOPES et al. 2002; MARTINS et al. 2002; GIL et al. 2002).

Até agora, pouquíssimos estudos documentaram resultados sobre a expressão de complexos de moléculas de adesão, que são responsáveis por mediar a interação célula-célula e célula-matriz extracelular.

Responsáveis por mediar a adesão célula-célula, somente a expressão de E-caderina foi estudada no carcinoma de pênis, correlacionando-se significativamente com o risco de metástase linfonodal (CAMPOS et al. 2006).

Nas interações de adesão célula-matriz extracelular, a expressão de CD82 demonstrou que a sua redução ou a sua ausência levou à metástase linfonodal e a sua expressão positiva levou a um melhor prognóstico (PORTZEL et al. 2008). Já as gelatinases estão superexpressas em tumores profundamente invasivos, comparados com tumores que exibem padrão exofítico de crescimento (SOARES et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2006a).

No presente estudo, foram avaliados os marcadores do complexo protéico CD44/ERM (Ezrina, Radixina e Moesina), sendo que nenhum destes marcadores se associou de maneira positiva à presença de metástases linfonodais.

Membro da superfamília ERM (Ezrina, Radixina e Moesin), Ezrina atua como ligante entre a membrana celular e a actina do citoesqueleto (GARY e BRETSCHER 1995), desempenhando um importante papel na manutenção da estrutura e da polaridade celular.

Tem participação na migração celular, sinalização, regulação do crescimento e diferenciação (BROWN et al. 2005). Pode interagir com diversas proteínas de membranas como CD44 (YONEMURA et al. 1998), o que o torna ativamente envolvido na regulação do crescimento tumoral e na capacidade metastática do câncer. Alguns estudos demonstraram que altos níveis de CD44 estão associados ao potencial invasivo e metastático de células tumorais. Esses achados contrariam nossos resultados, já que a diminuição da expressão de CD44 correlacionou-se positivamente com a invasão perineural e com a infiltração de corpo cavernoso, sugerindo, desta forma, que a subexpressão de CD44 pode estar diretamente ligada à

diminuição ou à falta de adesão celular, promovendo o caráter invasivo do tumor.

Além disso, a Ezrina promove a sobrevivência da célula epitelial ativando a via PI3-kinase/Akt e protegendo-a da indução de apoptose (GAUTREAU et al. 1999).

A inativação de Ezrina causa uma massiva retração celular, o que leva ao rompimento tanto da adesão célula-célula, quanto da adesão célula-matriz. Em células de insetos, a super expressão de Ezrina resulta em ganho de adesão celular (YAO et al. 1996; DRANSFIELD et al. 1997).

Ainda não se têm relatos sobre o comportamento da expressão de Ezrina no carcinoma de pênis. Porém, diversos estudos, com diversos tipos de câncer, já foram realizados levando-se em conta a sua expressão protéica.

A superexpressão de Ezrina e/ou seu desequilíbrio podem contribuir para o comportamento metastático do tumor. No tumor primário de pacientes inicialmente livres de metástase está fortemente associada ao desenvolvimento de metástase durante o seguimento e, conseqüentemente, também a uma baixa sobrevida (WENG et al. 2005). Isso contraria os nossos achados, já que a expressão de Ezrina influenciou significativamente a sobrevida livre de doença e não se correlacionou com a presença de metástase.

Estudos prospectivos mostraram correlação entre níveis de expressão de Ezrina e progressão tumoral (YU et al 2004; KHANNA et al. 2004; ILMONEN et al. 2005). Em cânceres pediátricos foi identificado como

componente importante do processo metastático (YU et al. 2004; KAUL et al. 1996). O mesmo foi demonstrado para osteosarcoma, rabdomiosarcoma e melanoma (MAKITIE et al. 2001; KHANNA et al. 2004; YU et al. 2004; ELLIOT et al. 2005; ILMONEN et al. 2005), onde a superexpressão de Ezrina correlacionou-se significativamente com o prognóstico ruim.

De modo similar, correlações significativas entre a expressão de Ezrina e malignidade foram demonstrados em astrocitomas (GEIGER et al. 2000), osteosarcoma (FERRARI et al. 2008), câncer de mama (LI et al. 2008), carcinoma nasofaríngeo (SHEN et al. 2008), câncer de próstata (MUSIAL et al. 2007) e câncer colorretal (WANG et al. 2009).

Ainda, uma alta expressão de Ezrina foi encontrada em lesões precursoras de tumor em adenocarcinomas de endométrio e próstata (OTHANI et al. 1999; PANG et al. 2004). Evidências mostram que a expressão de Ezrina é mais elevada na maioria dos tumores mesenquimais comparados com os tumores epiteliais (BRUCE et al. 2007).

O oposto foi observado por MOILANEN et al. (2003). Eles reportaram que o epitélio ovariano saudável apresentou alta imunorreatividade para Ezrina, mas expressão fraca ou negativa para a mesma em carcinoma ovariano, sendo associado à baixa sobrevida, grau histológico do tumor e idade avançada do paciente. BAL et al. (2007) observaram uma alta imunorreatividade em mucosa gástrica normal, mas no carcinoma difuso houve uma diminuição da sua expressão em comparação com a mucosa normal. A expressão de Ezrina mostrou uma correlação inversa com a

presença de metástase linfonodal e invasão do espaço linfovascular em carcinoma gástrico.

Os resultados de VALDMAN et al. (2005), GEIGER et al. (2000) e CHEN et al. (2001) demonstraram um aumento gradual da expressão de Ezrina seguido de progressão tumoral e perda de diferenciação.

Para YEH et al. (2009), no carcinoma hepatocelular, a expressão de Ezrina está relacionada à condição da diferenciação tumoral e da habilidade da invasão vascular, mas não teve impacto significativo na sobrevida dos pacientes, tendo relação inversa ao tamanho do tumor.

Em nosso estudo, a expressão positiva de Ezrina, assim como a expressão positiva de Moesina, correlacionou-se significativamente com a postectomia. Além disso, mostrou-se positivamente associada ao grau de diferenciação histológica do tumor.

Sabe-se que a ocorrência de fimose compreende um dos fatores de risco da doença, porém, não se tem relatos científicos que comprovem a relação significativa entre as expressões positivas de Ezrina e Moesina em pacientes postectomizados, sugerindo, assim, estudos mais aprofundados que enfatizem ou descartem a relevância de tal correlação na progressão do carcinoma de pênis.

Não houve nenhum tipo de associação significativa com a expressão positiva de Radixina, levando a sugerir que esta proteína não seja um bom marcador para se avaliar a progressão do câncer de pênis.

De acordo com nossos achados, a expressão protéica de Ezrina, no carcinoma de pênis, parece ser fator prognóstico independente na sobrevida

livre de doença, podendo vir a ser um importante marcador molecular no carcinoma de pênis. Porém, os resultados sugerem que são necessárias outras investigações para melhor definir o padrão de expressão do complexo CD44/ERM.

6 CONCLUSÕES

Avaliando-se as expressões protéicas de CD44 e da família ERM (Ezrina, Radixina e Moesina) e correlacionando-as ao quadro clínico-patológico e ao comportamento clínico de pacientes portadores de carcinoma de pênis, pôde-se observar que:

1. A expressão diminuída de CD44 correlacionou-se significativamente com a invasão perineural e com a infiltração de corpo cavernoso.
2. A expressão positiva de Ezrina correlacionou-se significativamente com a postectomia e com o grau de diferenciação histológica do tumor.
3. Não houve nenhum tipo de correlação significativa com a expressão de Radixina, embora ela tenha se mostrado praticamente significativa com relação à idade.
4. A expressão positiva de Moesina correlacionou-se significativamente com a raça e com a postectomia.
5. Não houve nenhuma associação significativa entre as variáveis imunoistoquímicas avaliadas e a presença de metástases linfonodais.

6. Ezrina influenciou significativamente a sobrevida livre de doença.
7. Nenhuma das variáveis imunoistoquímicas avaliadas influenciou significativamente a sobrevida câncer específica e a sobrevida global.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Bal N, Yildirim S, Nursal TZ, Bolat F, Kayaselçuk F. Association of ezrin expression in intestinal and diffuse gastric carcinoma with clinicopathological parameters and tumor type. **World J Gastroenterol** 2007; 13:3726-9.

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

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

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

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

Brown KL, Birkenhead D, Lai JC, Li L, Li R, Johnson P. Regulation of hyaluronan binding by F-actin and colocalization of CD44 and phosphorylated ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins in myeloid cells. **Exp Cell Res** 2005; 303: 400-14.

Bruce B, Khanna G, Ren L, et al. Expressiom of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. **Clin Exp Metastasis** 2007; 24: 69-78.

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

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

Chen Z, Fadiel A, Feng Y, Othani K, Rutherford T, Naftolin F. Ovarian epithelial carcinoma tyrosine phosphorylation, cell proliferation, and ezrin translocation are stimulated by interleukin 1 alpha and epidermal growth factor. **Cancer** 2001; 92: 3068-75.

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

Cubilla AL, Ayala G, Lopes A, et al. Perineural invasion (PNI) predicts mortality in penile squamous cell carcinoma. A long-term outcome study comparing clinico-pathologic features. **Lab Invest** 2007; 87:142A.

Cubilla AL, Dillner J, Schellhamer PF et AL. Tumors of the penis: pathology and genetics. **Malignant epithelial tumors**. IN: Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: WHO, IARC Press, 2004.

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

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

Dean AL Jr. Epithelioma of the penis. **J Urol** 1935; 33:252-83.

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

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

Dransfield DT, Bradford AJ, Smith J, et al. Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. **EMBO J** 1997; 16:35-43.

Droller MJ. Carcinoma of the penis; an overview. **Urol Clin North Am** 1980; 7:783-84.

Elliot BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. **Breast Cancer Res** 2005; 7:R365-R373.

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

Ferrari S, Zanella L, Alberghini M, Palmerini E, Staals E, Bacchini P. Prognostic significance of immunohistochemical expression of ezrin in non-metastatic high-grade osteosarcoma. **Pediatr Blood Cancer** 2008; 50:752-756.

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

Gary R, Bretscher A. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. **Mol Biol Cell** 1995; 6:1061-1075.

Gautreau A, Pouillet P, Louvard D, Arpin M. Ezrin, plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:7300-5.

Geiger KD, Stoldt P, Schlote W, Derouiche A. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. **Am J Pathol** 2000; 157:1785-93.

Gil AO, Pompeo ACL, Sarkis AS, Matsuo M, Motta THB, Arap S. Evaluation of the influence of protein p53 in penile carcinoma. **Braz J Urol** 2002; 28:33-9.

Giltneane JM, Rimm DL. Technology Insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology. **Nat Clin Pract Oncol** 2004; 1:104-11.

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

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

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

Guimarães GC, da Cunha IW, Soares FA, Nonogaki S, Lopes A, Campos RSM. 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** 2006a; 449:637-46.

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** 2006b; 68:148-53.

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

Hegarty PK, Kayes O, Freeman A, Christopher N, Ralph DJ, Minhas S. A prospective study of 100 cases of penile cancer managed according to European Association of Urology guidelines. **BJU Int** 2006; 98:526-31.

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.

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

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

Ilmonen S, Vaheri A, Asko-Seljavaara S, Carpen O. Ezrin in primary cutaneous melanoma. **Mod Pathol** 2005; 18:503-10.

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

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

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

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

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

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

Kaul SC, Mitsui Y, Komatsu Y, Reddel RR, Wadhwa R. A highly expressed 81 kDa protein in immortalized mouse fibroblast: its proliferative function and identity with ezrin. **Oncogene** 1996; 13: 1231-7.

Khanna C, Wan X, Bose S, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. **Nat Med** 2004; 10:182-6.

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

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

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

Li Q, Wu M, Wang H, et al. Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells. **Cancer Lett** 2008; 261:55-63.

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

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

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

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

Lopes A, Bezerra 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.

Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Günthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. **J Cell Biol** 1994; 124:71-82.

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

Makitie T, Carpen O, Vaheri A, Kivela T. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2001; 42:2442-9.

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

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

Martins AC, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci Jr S. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. **J Urol** 2002; 167:89-92.

Megalli MR, Veenema RJ, Gursel E. Simplified bone marrow biopsy needle for staging of carcinoma of prostate. **Urology** 1973; 1:154-5.

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

Moilanen J, Lassus H, Leminen A, Vaheri A, Butzow R, Carpen O. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients. **Gynecol Oncol** 2003; 90:273-81.

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

Musial J, Sporny S, Nowicki A. Prognostic significance of e-cadherin and ezrin immunohistochemical expression in prostate cancer. **Pol J Pathol** 2007; 58:235-43.

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.

[NCB] National Cancer Institute. **Penile cancer**. Disponível em: <URL:<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/penile/>> [2010 Maio 31].

Othani K, Sakamoto H, Rutherford T, Chen Z, Satoh K, Naftolin F. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells. **Cancer Lett** 1999; 147:31-8.

Othani K, Sakamoto H, Rutherford T, et al. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma. **Cancer Lett** 2002; 179:79-86.

Pakkanen R, Hedman K, Turunen O, Wahlstrom T, Vaheri A. Microvillus-specific Mr 75,000 plasma membrane protein of human chorio-carcinoma cells. **J Histochem Cytochem** 1987; 135:809-816.

Pang ST, Fang X, Valdman A, et al. Expression of ezrin in prostatic intraepithelial neoplasia. **Urology** 2004; 63:609-12.

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

Peclat de Paula AA, Almeida Netto JC, Cruz AD, Freitas Júnior R. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. **Rev Bras Cancerol** 2005; 51:243-52.

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

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

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

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

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

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

Shen ZH, Chen XY, Chen J. Impact of up-regulating Ezrin expression by Epstein-Barr virus latente membrane protein 1 on metastasis ability of nasopharyngeal carcinoma cells. **Ai Zheng** 2008; 27:165-9.

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

[SBU]. Sociedade Brasileira de Urologia. **Sociedade Brasileira de Urologia divulga pesquisa inédita sobre câncer de pênis e prepara mutirão**. 2007. Disponível em: <URL:http://www.sbu.org.br/pdf/bolu_232-2007.pdf> [2009 ago. 3].

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

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

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

Terpe HJ, Stark H, Prehm P, et al. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal ephitelial of non-malignant human fetal and adult tissues. **Histochemistry** 1994a; 101:79-89.

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

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

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

Valdman A, Fang X, Pang ST, Nilsson, B, Ekman P, Egevad L. Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue. **Eur Urol** 2005; 48:852-7.

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

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

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

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

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

Wang HJ, Zhu JS, Zhang Q, Sun Q, Guo H. High level of ezrin expression in colorrectal cancer tissues is closely related to tumor malignancy. **World J Gastroenterol** 2009; 15:2016-19.

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

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

Weng WH, Ahlén J, Aström K, Lui WO, Larsson C. Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissues sarcomas. **Clin Cancer Res** 2005; 11:6198-204.

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

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

Yao X, Cheng L, Forte JG. Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. **J Biol Chem** 1996; 271:7224-9.

Yeh CN, Pang ST, Chen TW, Wu RC, Weng WH, Chen MF. Expression of ezrin is associated with invasion and dedifferentiation of hepatitis B related hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer** 2009; 9:233.

Yonemura S, Hirao M, Doi Y, et al. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43 and ICAM-2. **J Cell Biol** 1998; 140:885-95.

Yu Y, Khan J, Khanna C, Helman L, Meltzer PS, Merlino G. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. **Nat Med** 2004; 10:175-81.

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

Anexo 1 - Ficha de Levantamento de Dados

Juliana Bartholo de Andrade

Projeto de Tese - Correlação Clínico-Patológica da Expressão Protéica do Complexo CD44/ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) no Carcinoma de Pênis.

01. N° do estudo
02. RG
03. Data da Admissão __/__/__
04. Idade a Admissão (anos)
05. Estado Civil - (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) Outros (9) Ign
06. Raça - (1) Branca (2) Amarela (3) Negra (4) Ign
07. Sinais / Sintomas - (1) Ferida (2) Dor (3) Inflamação (4) Disúria (5) Prurido (6) Outros (9) Ign
08. Tempo de Evolução (meses) -
09. Antecedentes Venéreos - (0) Não (1) Sim
10. Postectomia - (0) Não (1) Não relacionada (2) Relacionada (9) Ign
11. Situação a 1ª consulta - (1) Biopsiado (2) Amputado (3) Esvaziado (4) Intacto (9) Ign
12. Estadiamento cT - (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx
13. Estadiamento cN - (0) N0 (1) N1 (2) N2 (3) N3 (4) N4 (9) Nx
14. Estadiamento cM - (0) M0 (1) M1 (9) Mx
15. Data da amputação/ ressecção __/__/__
16. Cirurgia - (0) Não (1) Amp. Parcial (2) Amp. Total (3) Exerese

- (4) Postectomia ☐
17. Tipo de esvaziamento ganglionar - (0) Não (1) Inguinal (2) Inguino-ilíaco (9) Ign. ☐
18. Intenção do esvaziamento - (1) Princípio (2) Necessidade (9) Ign ☐
19. Data do esvaziamento - __/__/__
20. Complicações relacionadas à amputação - (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) Estenose (4) Hemorragia (9) Ign ☐
21. Complicações relacionadas ao esvaziamento - (0) Não (1) Infecção (2) Deiscência (3) Hematoma (4) Necrose (5) Linfedema (6) Ruptura de vasos (9) Ign. ☐
22. Número do AP - ☐☐☐☐☐☐☐☐
23. Grau de Diferenciação - (1) Bem diferenciado (2) Mod. Diferenciado (3) Pouco diferenciado (4) Não Classificado (9)Ign. ☐
24. Espessura do tumor - (1) Até 1 mm (2) 1-5mm (3) >5mm (9) Ign. ☐
25. Permeação linfática - (0) Não (1) Presente (9) Ign. ☐
26. Embolização venosa - (0) Não (1) Presente (9) Ign ☐
27. Infiltração de corpos carvenosos - (0) Não (1) Presente (9)Ign ☐
28. Infiltração da uretra - (0) Não (1) Presente (9)Ign ☐
29. Infiltração de órgãos adjacentes - (0) Não (1) Presente (9)Ign ☐
30. Alteração sugestiva de HPV (coilocotose) - (1) Presente (2) Ausente (9)Ign ☐
31. Total de Linfonodos examinados - ☐☐☐☐
32. Total de Linfonodos positivos - ☐☐☐☐
33. Lateralidade dos linfonodos positivos - (1)Unilat. (2) Bilateral (9) Ign ☐

34. Cadeia linfonodal Positiva - (1) Inguinal (2) Inguinal + Ilíaco (3) Ilíaco
(9)Ign |__|
35. Data da recidiva - __/__/__
36. Local da recidiva - (0) Não (1) Coto (2) Regional (3) Pulmões (4) Ossos
(5) Fígado (6) Outros (9)Ign. |__|
37. Tratamento da recorrência; (0) Não (1) RHD (2) Local (3) Regional (4)Rx
(5)Qt (6)Outro (9)Ign. |__|
38. Data do ultimo seguimento - __/__/__
39. Situação no seguimento - (1) Vivo sem doença (2) Vivo com doença
(3) Óbito por Câncer (4) Óbito por outra causa (5) perdido de vista |__|