



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança
Mestrado Acadêmico



PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DA PROTEÍNA P16^{INK4a}
ASSOCIADO A FATORES HISTOLÓGICOS E AO HPV NO
CÂNCER DE PÊNIS

Vicenilma de Andrade Martins

São Luís
2017

Vicenilma de Andrade Martins

**PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DA PROTEÍNA P16^{INK4a}
ASSOCIADO A FATORES HISTOLÓGICOS E AO HPV NO
CÂNCER DE PÊNIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

Área de Concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Orientador: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva.

Coordenador: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, PhD.

São Luís
2017

Vicenilma de Andrade Martins

**PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DA PROTEÍNA P16^{INK4a}
ASSOCIADO A FATORES HISTOLÓGICOS E AO HPV NO
CÂNCER DE PÊNIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em: ____/____/____.

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão - PPGSAC

Prof. Dr. George Castro Figueira de Mello (Examinador)
Centro Universitário do Maranhão - UNICEUMA

Profa. Dr. José de Ribamar Rodrigues Calixto (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão - PPGSAC

Profa. Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão - PPGSAC

São Luís
2017

DEDICATÓRIA

A minha mãe, irmã e namorado, Lurdecina de Andrade, Viceilma de Andrade e Herikson Costa, por me proporcionarem oportunidade de estudar e darem incentivo para nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Jeová, por não permitir perder minha fé diante dos obstáculos.

Aos meus pais, Lurdecina de Andrade, Benedito Pereira e Maria da Conceição, a minha irmã, Viceilma de Andrade, por toda força durante esses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gyl Eanes, por aceitar me orientar sem ao mesmo me conhecer e ao aprendizado que ele me proporcionou.

Ao meu namorado, Herikson Costa, por toda paciência, cumplicidade e dedicação, pois desde o meu seletivo enfrentei muitas dificuldades e ele esteve sempre ao meu lado apoiando e não deixou que eu desanimasse.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto e da Criança – PPGSAC-UFMA, pela oportunidade e a todos os funcionários que me receberam e acolheram muito bem.

A FAPEMA, pelo recurso para realização da pesquisa.

Aos amigos, Paula Tamara, Cristane Rocha, Adriana Lacerda, Thiago Leite e Evelin Feitosa, que foram as pessoas que me ajudaram no início do mestrado.

Aos amigos que sempre me ajudaram e incentivaram, Vanessa Ericeira, Mariane de Amarante, Rayssa Leilane, Rebeca Cutrim, Cleitiane Silva e Marja Monique.

Aos técnicos em Laboratório do LIME, Rayane Pessoa e Victor Maulen, por toda paciência em me ensinar e auxiliar nos procedimentos da pesquisa.

A toda equipe do IMOAB e HUPD por disponibilizar material necessário para esta pesquisa.

A doutoranda, Jaqueline Pinho, que em momento algum mediu esforços para me ajudar.

E não menos importante, a todos os professores do PPGSAC/UFMA por todo conhecimento que adquiri durante esses anos de mestrado.

*Ninguém é tão sábio que não tenha
algo a aprender e nem tão tolo que não
tenha algo a ensinar.*

(Blaise Pascal)

RESUMO

A infecção pelo HPV é descrita na literatura em 30-50% dos casos de câncer de pênis. A expressão imunohistoquímica de p16^{INK4a} é utilizada como indicativo da presença de HPV e marcador prognóstico para carcinomas escamosos de vários sítios. No entanto, seu papel no carcinoma de pênis ainda não está totalmente elucidado. O objetivo do estudo foi analisar, de forma prospectiva, se a expressão de p16^{INK4a} está associada a presença de HPV e parâmetros histológicos no câncer de pênis. Estudo prospectivo realizado no período de 2014 a 2016 com 55 casos de pacientes com carcinoma pênis. Foi realizada a detecção do DNA HPV por PCR em tecido tumoral a fresco e a imunohistoquímica para análise da proteína p16^{INK4a} em tecido parafinado. A avaliação de parâmetros histológicos foi realizada após inclusão total do tecido tumoral. O DNA HPV (genótipos de baixo risco e alto risco) foi encontrado em 49 (89,1%) casos, sendo 46 (83,6%) HR-HPV. Dos 22 casos p16^{INK4a} positivo, o DNA HR-HPV esteve presente em 21 (95,5%) deles ($p = 0,032$). Em relação a parâmetros histológicos, a p16^{INK4a} e o HR-HPV foram significativamente associados apenas ao subtipo do tumor ($p = 0,036$ e $p = 0,032$, respectivamente), sendo que todos os carcinomas com características basalóides foram p16^{INK4a} positivo. Utilizando amostra de tecido a fresco, a nossa casuística mostrou a mais alta incidência de HPV da literatura. A expressão da proteína p16^{INK4a} foi significativamente associada à presença do vírus HPV de alto risco oncogênico e pode servir como marcador da presença desse vírus. A proteína p16^{INK4a} não foi associada aos parâmetros prognósticos histológicos, exceto ao subtipo do tumor.

Palavras-chave: *Papillomaviridae*; Neoplasias Penianas; p16^{INK4a}.

ABSTRACT

Infection by HPV is described in the literature in 30-50% of cases of penile cancer. The immunohistochemical of p16^{INK4a} is used as an indication of the presence of HPV and prognostic marker for squamous carcinomas various sites. However, its role in penile carcinoma has not yet been completely elucidated. The aim of the study was to prospectively analyze whether the expression of p16INK4a is associated with the presence of HPV and histological parameters in penile cancer. A prospective study was conducted in the period 2014 to 2016 with 55 cases of patients with penile carcinoma. HPV DNA was detected by PCR in fresh tumor tissue and immunohistochemistry for analysis of p16INK4a protein in paraffin waxed tissue. The evaluation of histological parameters was performed after total inclusion of the tumor tissue. HPV DNA (low-risk and high-risk genotypes) was found in 49 (89.1%) cases, 46 (83.6%) HR-HPV. Of the 22 p16INK4a positive cases, HR-HPV DNA was present in 21 (95.5%) of them ($p = 0.032$). Regarding histological parameters, p16INK4a and HR-HPV were significantly associated only with the tumor subtype ($p = 0.036$ and $p = 0.032$, respectively), being that, all carcinomas with basaloid characteristics were positive p16INK4a. Using a fresh tissue sample, our sample showed the highest incidence of HPV in the literature. Expression of the p16INK4a protein was significantly associated with the presence of high oncogenic HPV virus and may serve as a marker for the presence of this virus. The p16INK4a protein was not associated with the histological prognostic parameters, except for the tumor subtype.

Key words: *Papillomaviridae*; Penile neoplasms and p16^{INK4a}.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do genoma do vírus HPV	26
Figura 2. Ação da proteína pRb sobre o ciclo celular	27
Figura 3: Ação da proteína p53 sobre o ciclo celular.....	28
Figura 4: Histopatológico do tecido de pênis do paciente, corado por Hematoxilina-Eosina	32
Figura 5: Padrões de expressão de p16 ^{INK4a} em carcinomas penianos	40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01. Sistema TNM (2010) - proposto pela UICC/AJCC para estadiamento do câncer de pênis e graduação histológica	18
Quadro 02. Estágio clínico segundo os grupos prognósticos do sistema de estadiamento TNM do câncer de pênis	20
Tabela 1. Prevalência da infecção HPV* estimada em metanálise de 78 estudos de mulheres com citologia cervical normal nos diferentes continentes	24
Tabela 2. Prevalência da infecção HPV em mulheres com citologia cervical normal	24
Tabela 3: Caracterização sociodemográfica e clínica na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017	37
Tabela 4: Distribuição das características histopatológicas na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017	38
Tabela 5: Distribuição das características do estadiamento TNM e do status da infecção do HPV na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017	39
Tabela 6: Perfil imunohistoquímico da proteína p16 ^{INK4a} na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017	41
Tabela 7: Associação da proteína p16INK4a às características histológicas e ao status da infecção pelo HR-HPV na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC - American Joint Committee on Cancer

CCE - Carcinoma de Células Escamosas

CDK - Ciclinas Quinases Dependentes

CDKI - Inibidor das Ciclinas Quinases Dependentes

CEP-HUUFMA - Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário

COMIC – Comissão Científica

DNA – ácido desoxirribonucleico

HPV - Papiloma Vírus Humano

HR-HPV - HPV de Alto Risco Oncogênico

IMOAB - Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo

IST - Infecção Sexualmente Transmissíveis

LIME/HUPD - Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica do Hospital Universitário Presidente Dutra

LR-HPV - HPV de Baixo Potencial Oncogênico

NIC - Neoplasia Intra-epitelial Cervical

OMS - Organização Mundial da Saúde

P14 – Proteína p14

P16^{INK4a} – Proteína p16^{INK4a}

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PV - Papilomavírus

SBU - Sociedade Brasileira de Urologia

TCLE - Termo de Compromisso Livre e Esclarecido

TNM: Tumor primário (T); Linfonodos regionais (N); Metástases distantes (M)

UICC - International Union Against Cancer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1. Câncer de Pênis	15
2.1.1. Epidemiologia do câncer de pênis	15
2.1.2. Etiologia do câncer de pênis	15
2.1.3. Aspectos clínicos e histopatológicos do câncer de pênis.....	17
2.1.4. Diagnóstico e tratamento do câncer de pênis.....	20
2.2. Papilomavírus humano – HPV	21
2.2.1. Considerações gerais sobre HPV	21
2.2.2. Epidemiologia do HPV	23
2.2.3. Ação do HPV no ciclo celular e câncer de pênis	25
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. METODOLOGIA	29
4.1. Tipo de Estudo.....	29
4.2. Período e local do estudo.....	29
4.3. Amostragem do estudo	29
4.4. Coleta de dados.....	30
4.5. Etapas do Estudo	30
4.6. Identificação histológica do HPV	31

4.7.	Técnica de imunohistoquímica (IHQ)	32
4.8.	Análise molecular do HPV	35
4.9.	Análise estatística	35
4.10.	Aspectos Éticos.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
6.	REFERÊNCIAS	44
7.	ANEXOS	54
8.	APÊNDICES.....	63
9.	PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO	67
9.1.	Nome do periódico com classificação na webqualis CAPES.....	67
9.2.	Normas editoriais/ normas para autores.....	67
9.3.	Artigo.....	68

1. INTRODUÇÃO

Nos países desenvolvidos o câncer de pênis é considerado raro, em países como o Canadá a frequência é de 0,5 a 1,3 casos para 100.000 habitantes (LYNCH, 2002; PARKIN *et al*, 2002). Porém, nos países em desenvolvimento como é o caso do Brasil essa frequência varia de 2,9 a 6,8 casos para 100.000 habitantes chegando a ser uma das maiores taxas de câncer de pênis do mundo (CURADO *et al.*, 2007; FAVORITO *et al.*, 2008; POW-SANG *et al.*, 2010). Fato alarmante acontece nas regiões Norte e Nordeste do país, onde é observada uma incidência 5 vezes maior desse câncer em relação as regiões Sul e Sudeste (BRASIL, 2003; DE SOUZA *et al*, 2011).

Dentre os tipos de câncer de pênis, o carcinoma de células escamosas é o mais prevalente (ORNELLAS & BROWN, 2004; MICALI *et al.*, 2006), representando 95% dos casos (POW-SANG *et al.*, 2002; ORNELLAS & BROWN, 2004; MICALI, G. *et al.*, 2006; VELAZQUEZ & CUBILLA, 2007).

Muitos são os fatores que podem estimular o desenvolvimento do câncer de pênis, empregando um caráter multifatorial a sua etiologia, a saber: presença de fimose, higienização inadequada do pênis, multiplicidade de parceiros sexuais, doenças sexualmente transmissíveis e até mesmo o tabagismo (MADEN *et al.*, 1993).

Vários estudos indicam associações entre o Papiloma Vírus Humano (HPV) com alguns tipos de câncer (BAHMANYAR *et al.*, 2012; BASU *et al.*, 2013). Entre todos os cânceres humanos, 15% são causados por infecções virais. O HPV está associado ao câncer cervical, mama, orofaringe, anal, vulvo-vaginal e câncer de pênis, tendo maior incidência nos cânceres de mama e cervical (ARBYN *et al.*, 2012; LAWSON; GLENN & WHITAKER, 2016).

No Brasil, a presença de HPV em pacientes com câncer de pênis foi registrada na década de oitenta (VILLA & LOPES, 1986). Alguns estudos demonstram uma prevalência do HPV em mais de 50% dos carcinomas de pênis (TORNESELLO *et al.*, 2008; CUBILLA *et al.*, 2010). Estudos apontam que pessoas infectadas com os tipos de HPV de alto risco oncogênico apresentam

maior predisposição para o desenvolvimento do tumor (TORNESELLO *et al.*, 2000; GIL *et al.*, 2001; ORNELLAS & BROWN, 2004).

Portanto, outro fator que vem sendo relacionado à etiologia do câncer de pênis é a presença de infecção pelo HPV. Em relação aos mecanismos que o levam causado pelo HPV ainda não estão totalmente elucidados, porém acredita-se que seja semelhante ao que acontece no carcinoma de colo uterino e vulva, onde as proteínas virais E6 e E7 se ligam e inativam produtos de genes supressores de tumores como proteína p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), ambos responsáveis pelo controle negativo da proliferação celular (SARKAR *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2003; SINGH; JHONSON & CHELLAPAN, 2010; WROCLAWSKI & SERPA NETO, 2010).

A proteína E6 liga-se e causa a degradação da p53 que é responsável por uma das principais vias de controle do ciclo celular, reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) e indução da morte celular por apoptose, causando crescimento celular sem reparo aos possíveis danos no DNA aumentando as chances da ocorrência de neoplasias. Já a proteína E7 inibe a atividade da pRb deixando o fator de transcrição E2F livre para desencadear o processo de replicação do DNA, induzindo aumento da expressão da proteína p16^{INK4a} que age inibindo as ciclinas quinases dependentes (CDK) tentando bloquear o ciclo, mas o feedback não funciona, pois, a proliferação das células infectadas não depende das CDK, causando acúmulo de p16^{INK4a} na célula infectada (VOUSDEN, 1993; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

A expressão imunohistoquímica de p16^{INK4a} é frequentemente utilizada como marcador substituto para presença de HPV de alto risco oncogênico em neoplasias cervicais e carcinoma de células escamosas em outros órgãos (FERREUX *et al.*, 2003; BRANCA *et al.*, 2004; JORDAN *et al.*, 2012). Ela também tem sido utilizada para auxiliar no diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau, para prever a progressão ou regressão da neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau e como marcador de melhor sobrevivência específica no câncer (CSS) (KLAES *et al.*, 2002, WANG *et al.*, 2004; BETHUNE *et al.*, 2012; CAROZZI *et al.*, 2013; GUNIA *et al.*, 2013). Entretanto, sabe-se pouco a respeito da associação da infecção por HPV com a expressão de p16^{INK4a} em pacientes com câncer de pênis. Assim, o objetivo do presente estudo é de analisar se há associação entre a expressão das proteínas p16^{INK4a} e fatores histológicos e ao status do vírus HPV no câncer de pênis.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Câncer de Pênis

2.1.1. Epidemiologia do câncer de pênis

O câncer de pênis atinge aproximadamente 1/100.000 homens em países desenvolvidos (VELAZQUEZ & CUBILLA, 2007; MICALI *et al.*, 2006). Entretanto, nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul chega a representar cerca de 10% a 20% dos tumores urogenitais masculinos, sendo considerado um problema de saúde pública (FONSECA *et al.*, 2010; BAROCAS; CHANG, 2010; CHRISTOULIDOU *et al.*, 2015).

O Brasil é um país com uma das maiores incidências de câncer de pênis no mundo. O Instituto Nacional do Câncer estimou mais de 4600 casos de câncer de pênis no Brasil em 2009, sendo a região Nordeste a mais prevalente (INCA, 2010).

Segundo o estudo epidemiológico sobre Câncer de Pênis da Sociedade Brasileira de Urologia – SBU (2007), o Maranhão tem 10,66% dos casos de câncer de pênis notificados no Brasil. Para Nardi *et al.* (2007), o Maranhão é o Estado que possui o maior número de casos de câncer de pênis no país, onde a incidência chega a representar 16% dos cânceres no homem, e para Favorito *et al.* (2008), essa incidência é de 22,7%.

Brumini (1982), Favorito *et al.* (2008) e Reis *et al.* (2010) mostraram que esta neoplasia acomete geralmente homens de classe social e nível de escolaridade baixos, sendo sua maior incidência em regiões mais carentes dos países em desenvolvimento. A faixa etária mais acometida está entre 50 e 70 anos, apresentando pico de incidência na terceira idade, a partir dos 70 anos. No entanto os jovens também podem ser afetados (FAVORITO *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2010).

2.1.2. Etiologia do câncer de pênis

A etiologia do câncer de pênis, apesar de pouco conhecida, é considerada multifatorial. Semelhante a outros cânceres, essa neoplasia apresenta múltiplos fatores de risco incluindo idade,

predisposição genética e exposição à carcinógenos ambientais como cigarro (ZEQUI *et al.*, 2012). Fatores como a falta de higiene adequada, zoofilia e multiplicidade de parceiros sexuais aumentam o risco de infecção pelo HPV e estão envolvidos na carcinogênese deste tumor (DILLNER *et al.*, 2000; WROCLAWSKI & SERPA NETO, 2010; ZEQUI *et al.*, 2012).

Outros fatores de risco para o câncer de pênis são a fimose e a infecção pelo HPV (KAYES *et al.*, 2007; FERRÁNDIZ-PULIDO *et al.*, 2012; CHRISTOULIDOU *et al.*, 2015). A fimose está presente em 25% a 85% dos pacientes com esse tipo de câncer e a infecção pelo HPV representa risco relativo de 64,6 vezes para essa neoplasia (AUSTIN, 2010; PIZZOCARO *et al.*, 2012).

Nos países que têm como hábito a circuncisão neonatal, verifica-se uma baixa incidência do carcinoma de células escamosas do pênis (CCE) (SCHOEN *et al.*, 2000; CASTELLSAGUÉ *et al.* 2002; MICALI *et al.*, 2006). Mesmo que não tenha sido encontrado um carcinógeno específico no esmegma, a higienização inadequada da glândula leva ao acúmulo de esmegma que associado a *Mycobacterium smegmatis* causa irritação crônica do epitélio contribuindo para gênese do câncer (PLAUT & KOHN-SPEYER, 1947). Assim, a higiene adequada e a circuncisão precoce previnem a ocorrência da neoplasia na idade adulta (POW-SANG *et al.*, 2002; MICALI *et al.*, 2006).

Em relação ao vírus do HPV, estudos realizados utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostraram a presença do vírus variando de 30-50% dos casos (BEZERRA *et al.*, 2001; CUBILLA *et al.*, 2010; CUBILLA *et al.*, 2011; FERRÁNDIZ-PULIDO *et al.*, 2013; STEINESTEL *et al.*, 2015).

No estudo realizado por Tornesello *et al.* (2000), o HPV foi identificado em 70 a 100% das neoplasias intra-epiteliais e em 40-50% dos casos de carcinoma de pênis invasivo.

Os tumores penianos tendem a crescer lentamente, e, quando se encontram em um estágio inicial, possuem elevada taxa de cura (DEEM *et al.*, 2011). São mais comuns na glândula, quando não tratados estendem-se para o prepúcio e evoluem infiltrando tecidos adjacentes como o tecido subepitelial conjuntivo, o corpo esponjoso e o corpo cavernoso até invadir órgãos adjacentes como próstata e bexiga levando à auto-amputação. Metástases linfonodais nas regiões femoral e ilíaca são vias de disseminação no carcinoma de pênis (MICALI *et al.*, 2006; VELAZQUEZ *et al.*, 2008).

Cerca de 50% dos pacientes sobrevivem cinco anos, contudo o prognóstico é variável em função do acometimento de linfonodos, da existência de metástases e do grau histológico (CUBILLA *et al.*, 2004; POMPEO *et al.*, 2006; HEYNS *et al.*, 2010).

2.1.3. Aspectos clínicos e histopatológicos do câncer de pênis

Noventa e cinco por cento das neoplasias que ocorrem no pênis são representadas pelo carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso (CEC) onde a incidência no Brasil é de 8,3 casos por 100.000 habitantes (ROSSARI; VORA, 2010); as outras neoplasias de pênis decorrem de metástases originadas em tumores de outros órgãos, representados pelos sarcomas, carcinoma basocelular e, muito raramente, melanomas (DROLLER, 1980; CULKIN; BEER, 2003; RIPPENTROP *et al.*, 2004).

O *American Joint Committee of Cancer* reconhece 4 subtipos de Carcinoma Epidermóide de pênis: Verrucoso, Papilar, Condilomatoso e Basaloide (VUICHOUD *et al.*, 2012). O principal subtipo histológico do CEC é o usual (48-65%), seguido pelo condilomatoso (17%), verrucoso (8%), papilar (7-10%) e basaloide (5-15%) (CUBILLA *et al.*, 2009; CHAUX *et al.*, 2010). O subtipo verrucoso é conhecido por ser de baixo potencial maligno, enquanto os outros tipos têm um pior prognóstico (VUICHOUD *et al.*, 2012).

As lesões malignas do pênis podem ser classificadas em ulcerativas, vegetativas e nodulares. Para análise do tamanho da lesão, pesquisadores estratificam em intervalos de $\leq 0,5$ cm, 0,6 – 2,0 cm, 2,1 – 5,0 cm e $\geq 5,1$ cm (WANICK *et al.*, 2011).

Quanto a graduação e diferenciação histológica é baseada no sistema de graduação de Broders (PIZZOCARO *et al.*, 2010). Este sistema baseia-se fundamentalmente no grau de queratinização, número de mitoses e no pleomorfismo nuclear (LUCIA & MILLER, 1991). Assim, os seguintes grupos são identificáveis: grau x, grau de diferenciação não pode ser avaliado; grau I, bem diferenciado; grau II, moderadamente diferenciado; grau III, indiferenciado (ROYAL COLLEGE OF PATHOLOGISTS, 2006).

A graduação histológica geralmente correlaciona-se com profundidade do tumor e risco de metástase inguinal. Alguns autores encontraram associação entre lesões de alto grau, maior risco de comprometimento de linfonodos inguinais e maior risco de óbito pela doença (THEODORESCU *et al.*, 1996; JOEL *et al.*, 2001; SOLSONA *et al.*, 2001). A probabilidade de metástases linfonodais aumenta com o grau de indiferenciação celular (25%, grau I; 50%, grau II e 80%, grau III) (CUBILLA *et al.*, 2001).

Em relação ao estadiamento do câncer peniano, ele é importante, pois, além de orientar a conduta terapêutica, fornece informações sobre a probabilidade de cura e prognóstico (PIZZOCARO *et al.*, 2010).

O sistema de estadiamento mais utilizado entre os clínicos é o sistema TNM mantido pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e da *União Internacional para o Controle do Câncer* (UICC). Este sistema codifica a extensão do tumor primário (T), linfonodos regionais (N) e metástases distantes (M) e fornece um "agrupamento estático" baseado em T, N e M (PIZZOCARO *et al.*, 2010; CUBILLA *et al.*, 2004; INCA, 2004).

O sistema TNM é atualizado periodicamente com base em avanços na compreensão do prognóstico do câncer. A última revisão do TNM, apresentada na *7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual* (vide quadros 1 e 2) que entra em vigor em casos diagnosticados em ou após 1º de janeiro de 2010 (EDGE, 2010).

Quadro 01. Sistema TNM (2010) - proposto pela UICC/AJCC para estadiamento do câncer de pênis e graduação histológica.	
Estágio	Descrição
Tumor (T)	
Tx	Tumor primário não é passível de avaliação
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Tumor verrucoso não invasivo

T1	Tumor invade tecido conectivo subepitelial
T1a	Sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado (Grau 1-2)
T1b	Com invasão linfovascular ou pouco diferenciado/indiferenciado (Grau 3-4)
T2	Tumor invade corpo esponjo/ corpo cavernoso
T3	Tumor invade a uretra
T4	Tumor invade outras estruturas adjacentes
Linfonodos regionais	
NX	Linfonodos regionais não passíveis de avaliação
N0	Sem evidência de infiltração
N1	Metástase unical
N2	Metástase múltiplas ou bilaterais superficiais
N3	Metástase em linfonodos profundos pélvicos ou inguinais
Metástase distante	
MX	Metástase distante não é passível de avaliação
M0	Nenhuma metástase distante
M1	Metástase à distância
Graduação Histopatológica	
Gx	O grau de diferenciação não pode ser avaliado
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado
G4	Indiferenciado
Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010.	

Quadro 02. Estágio clínico segundo os grupos prognósticos do sistema de estadiamento TNM do câncer de pênis.			
Estágio anatômico	Sistema de estadiamento TNM		
Estágio 0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
Estágio I	T1a	N0	M0
Estágio II	T1b	N0	M0
	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Estágio IIIa	T1-3	N1	M0
Estágio IIIb	T1-3	N2	M0
Estágio IV	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1
Fonte: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010.			

2.1.4. Diagnóstico e tratamento do câncer de pênis

Os pacientes com câncer de pênis são diagnosticados por exames clínicos, de imagem e histopatológicos (CUBILLA *et al.*, 2004; POMPEO *et al.*, 2010). A avaliação clínica deve mostrar localização, tamanho, diâmetro, número de lesões, morfologia, extensão da neoplasia primária e invasão de outras estruturas, além da presença de linfonodos aumentados (PIZZOCARO *et al.*, 2010).

Ocasionalmente podem ser realizados exames de imagem para o diagnóstico do câncer de pênis. Biópsia incisional ou excisional é necessária para confirmação histológica e quando não é possível o exame de palpação inguinal a tomografia computadorizada é utilizada para diagnóstico (FAY, 2014).

Em relação ao tratamento, deve ser individualizado e basear-se nas características da lesão primária e no estadiamento TNM. Entre as diversas modalidades terapêuticas, o tratamento cirúrgico continua sendo o mais empregado e com melhores resultados (POMPEO *et al.*, 2010).

O tratamento do câncer de pênis deve iniciar pela abordagem da lesão primária e das regiões inguinais. A lesão primária deve preferencialmente ser tratada por cirurgia, onde a extensão varia desde postectomia, amputações parciais e totais e até emasculação, podendo ser aliada a técnicas de reconstrução (PAULA *et al.*, 2005; GREENBERG, 2010).

Outras formas de tratamento incluem laser terapia, crioterapia, microcirurgia a Mohs e radioterapia que ficam reservadas aos pacientes que recusam cirurgia (PAULA *et al.*, 2005; POMPEO *et al.*, 2006). E nos casos de linfonodos positivos a linfadenectomia inguinal completa é realizada sendo que a quimioterapia adjuvante deve ser considerada nos pacientes com mais de dois linfonodos positivos, extensão extra nodal, ou metástases pélvicas (PIZZOCARO *et al.*, 1997; PAGLIARO *et al.*, 2010).

O diagnóstico precoce e o prognóstico do câncer de pênis são grandes desafios atualmente devido a ausência de marcadores, como ocorre no câncer de próstata. Por esse motivo, as pesquisas têm se concentrado na identificação de biomarcadores (FIQUEIROA *et al.*, 2014).

2.2. Papilomavírus humano – HPV

2.2.1. Considerações gerais sobre HPV

Desde a Grécia antiga se tem registros de lesões verrucosas e papilomatosas. As primeiras pesquisas sobre o Papilomavírus (PV) se deram no início do século XX, tendo como principais descobertas os achados de Rous e Kidd (1938), o qual descreveu que o PV é o principal agente etiológico de verrugas em coelhos, bem como em diversos tipos de mamíferos, inclusive no homem (Papilomavírus Humano – HPV). Eles também mostraram o potencial oncogênico do PV pela transformação maligna de células hospedeiras.

A estrutura do genoma do HPV foi descoberta por Crawford e Crawford em 1963. Entretanto, o interesse sobre o HPV reduziu nos anos subsequentes até o início da década de 1970, devido a impossibilidade de um sistema de cultura de células e principalmente pela aparente natureza benigna das verrugas humanas (LETO *et al.*, 2011). Os estudos sobre HPV retomaram em 1977 com a hipótese de que o HPV participava da etiologia dos cânceres de colo de útero (ZUR

HAUSEN, 1977). Houve um crescimento exponencial das pesquisas a partir dos anos 1980, no qual se registrou alguns tipos de HPV, sendo que desses os do tipo 16 e 18 foram relacionados diretamente com o câncer uterino (VILLIERS *et al.*, 1987). O primeiro estudo epidemiológico sobre HPV e câncer do colo de útero também foi de Villiers *et al.* (1987). A partir de então, vários estudos moleculares e epidemiológicos confirmam que a infecção cervical por certos tipos de HPVs é um evento precursor na gênese da neoplasia de colo uterino (LETO *et al.*, 2011). A maioria das doenças relacionadas ao HPV são causadas por quatro tipos deste vírus, a saber: HPV tipo 6, 11, 16 e 18. Dentre os casos de câncer do colo de útero 70% são relacionados à infecção pelo HPV 16 e 18; já os tipos 6 e 11 causam aproximadamente 90% das verrugas genitais (SCHIFFMAN & CASTLE, 2003).

A infecção pelo HPV afeta tanto homens quanto mulheres, instalando-se na pele ou em mucosas. Das infecções sexualmente transmissíveis, a maioria é causada por HPV. Este vírus é responsável pelo desenvolvimento de papilomas e tumores de células escamosas nas regiões genitais como colo do útero, pênis, anus, bem como na região esofagiana, trato sino-nasal, laringe e brônquios, destes, o câncer de colo do útero é o mais estudado mundialmente. Assim, os mecanismos de infecção, ciclo de vida e do mais que se tem conhecimento são baseados principalmente em estudos deste tipo de câncer (MORK *et al.* 2001; MOJOR *et al.* 2005; STTENBERGEN *et al.* 2005; SYRJÄNEN 2005).

O vírus do HPV pode ser transmitido por única exposição ao contato direto com a pele de uma pessoa infectada (MUÑOZ *et al.*, 2003). Mesmo com o uso do preservativo ainda existe risco de transmissão desse vírus, uma vez que esta é capaz de barrar apenas cerca de 70% a 80% das transmissões (INSTITUTO DO HPV, 2013). Os primeiros dois ou três anos de vida sexualmente ativa podem ser o suficiente para a contaminação pelo HPV. Das pessoas que tiveram contato sexual com parceiros contaminados, dois terços desenvolverão infecção pelo HPV no período de três meses (OMS/ICO, 2011). E segundo Shew *et al.* (2013), cerca de 50% das mulheres adquirem o HPV meses antes da primeira relação sexual, provavelmente devido ao contato íntimo com seu parceiro.

O vírus do HPV pode permanecer latente no organismo durante anos. Alguns tipos podem permitir o desenvolvimento de alterações celulares, que podem evoluir para diversas patologias

que se relacionam com esse vírus (SMITH *et al.*, 2007). A alteração celular relacionada à infecção pelo HPV mais estudada é a alteração das células do epitélio que revestem o colo do útero; este processo também é denominado de displasia cervical ou neoplasia intra-epitelial cervical (NIC). A NIC é graduada em duas (NIC de baixo e alto grau) ou em três (a NIC 1, 2 e 3). Quanto maior for esta graduação, maior será a possibilidade de mulheres desenvolverem câncer de colo do útero (SMITH *et al.*, 2007). O potencial oncogênico do HPV pode ser classificado como de alto ou de baixo risco oncogênico, em que os vírus de alto risco oncogênico podem levar a alterações progressivas nas células, levando ao câncer, enquanto outros de baixo risco oncogênico podem causar verrugas e mudanças não cancerosas (BERNARD *et al.* 2010).

2.2.2. Epidemiologia do HPV

Dentre as infecções sexualmente transmissíveis (IST), a infecção genital pelo HPV é a mais frequente (BURCHELL *et al.*, 2006). Burchell e colaboradores (2006), relataram em seu trabalho que já foram identificados cerca de 200 tipos de HPV, destes mais da metade estão completamente sequenciados geneticamente e o restante com sequenciamento parcial. Como já citado no tópico anterior, o HPV pode ser classificado de acordo com o nível de risco para o desenvolvimento de um câncer. Muñoz *et al.*, (2003), classificaram do ponto de vista epidemiológico, principalmente os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26, 53, 66 e 73 como de alto risco oncogênico e os HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 70 como de baixo risco.

A disseminação da IST em uma população depende, principalmente da transmissibilidade do vírus (duração da infectividade), ou seja, uma infecção de maior duração tem impacto potencialmente maior (BURCHELL *et al.*, 2006). As infecções por HPV de alto risco oncogênico persistem mais tempo do que as de baixo risco oncogênico (TROTTER & FRANCO, 2006). Ainda não se sabe se durante todo o período que o HPV é detectado a sua transmissibilidade é a mesma.

Nos achados de Trotter e Franco (2006), a prevalência da infecção por HPV varia de 2 a 44% na população feminina. Um estudo de revisão bibliográfica (resultados apresentados na tabela 1), realizado com 78 estudos, apontou que a prevalência global de HPV é de 10,41% em mulheres

com citologia cervical normal (BURCHELL *et al.*, 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009), na América do Sul essa prevalência é de 13,2% e de 14,1% para o Brasil (Tabela 2). Outros estudos realizados no Brasil encontraram prevalência para população variando de 21 a 48% (CARVALHO *et al.*, 2003; FEDRIZZI; SCHLUP & MENEZES, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009), sendo o HPV de alto risco oncogênico encontrado em 48 a 53% dos casos.

Tabela 1. Prevalência da infecção pelo vírus HPV* estimada em metanálise de 78 estudos de mulheres com citologia cervical normal nos diferentes continentes.

Local	Nº Estudos	N	Prevalência ajustada (%)	95% IC
Global	78	157.879	10,41	10,16 – 10,67
África	08	6.226	22,12	20,87 – 23,43
América Latina	24	40.399	12,95	12,41 – 13,51
Europa	27	70.129	8,08	7,77 – 8,41
Ásia	19	41.125	7,95	7,53 – 8,40

* Ajustada por região, tipo de estudo, ano de publicação, forma de coleta da amostra, meio de armazenamento celular, técnica para detecção de HPV, primer utilizado e idade para cada estudo. Não foi reportado nenhum dado da Oceania. Fonte: Burchell NA, Sanjosé S, Franco EL. Vaccine 2006; 24S3: 52-61. IC: intervalo de confiança.

As diferentes prevalências entre as diversas regiões do mundo apresentadas na tabela 1, podem ser influenciadas por diversos fatores, a saber: comportamento sexual, crença religiosa, tabagismo, paridade, anticoncepção, entre outros (BURCHELL *et al.*, 2006).

Tabela 2. Prevalência de infecção pelo vírus HPV em mulheres com citologia cervical normal.

Local	N	Prevalência HPV (%)	95% IC
Brasil	5.582	14,1	13,2 – 15,1
América do Sul	17.500	13,2	12,7 – 13,7
Mundo	436.430	11,4	11,3 – 11,5

Fonte: WHO/ICO. HPV Information Centre. Human Papillomavirus and Related Cancers – Brazil, Summary Report 2009. IC: intervalo de confiança.

Para a OMS (2009), a prevalência do HPV no Brasil pode vir a caracterizar uma epidemia, uma vez que se estima cerca de 9 a 10 milhões de infectados no país, e a cada ano podendo surgir mais 700 mil casos. No mundo cerca de 630 milhões de homens e mulheres estão infectadas pelo HPV, em uma razão de 1 para 10 pessoas.

Em relação aos homens, os resultados do trabalho de Patridge e Koutsky (2006), apontaram que a prevalência da infecção pelo HPV varia de 3,5 a 45% para todos os tipos e 2,3 a 34,8% para

o HPV de alto risco oncogênico, sendo o 16 o mais frequente, e 2,3 a 23,9% para os HPV de baixo risco oncogênico. Já Franceschi *et al.* (2002), e Giuliano *et al.* (2008), mostraram que essa prevalência no Brasil varia de 35 a 72%, sendo o HPV de alto risco oncogênico responsável por 25 a 56% dos casos. Contudo, a prevalência global nos homens (7,9%) é menor do que nas mulheres (17,9%), provavelmente devido ao tecido peniano ser menos receptivo ao HPV do que o genital feminino (PATRIDGE & KOUTSKY, 2006).

2.2.3. Ação do HPV no ciclo celular e câncer de pênis

O vírus HPV está relacionado com a presença de tumores benignos como verrugas, papilomas e condilomas, e tumores malignos (GARCIA-CARRANCÁ & GARRI-GLIO, 1993). A associação do HPV e tumor peniano suscita considerações sobre a possibilidade deste vírus ser um provável agente etiológico do câncer de pênis (FIGUEIROA *et al.*, 2014).

O genoma viral apresenta cerca de 9 a 10 genes e é dividido em três regiões: região precoce (composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7), a região tardia (composta pelos genes L1 e L2), e a região controladora (URR) (Figura 1) (GARCIA-CARRANCÁ & GARIGLIO, 1993; MUÑOZ *et al.*, 2006).

Como relatado anteriormente esse vírus se divide em dois grupos: HPV de baixo risco e de alto risco oncogênico. O HPV de baixo risco oncogênico tende a manter o seu DNA íntegro, circular e episomal, diferente do HPV de alto risco oncogênico, cujas fitas de DNA circular se abrem, sofrem deleções e se integram ao genoma da célula hospedeira (SCHEURER *et al.*, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2006). Esse vírus inicialmente infecta as células camada basal, pois estas estão em fase de divisão e posteriormente sofrerão diferenciação levando a disseminação do DNA viral (Stubenrauch & Laimins, 1999).

Em estudos realizados utilizando a técnica de PCR a presença de HPV em carcinoma peniano variou de 30-50% dos casos (BEZERRA *et al.*, 2001; CUBILLA *et al.*, 2010; CUBILLA *et al.*, 2011; FERRÁNDIZ-PULIDO *et al.*, 2013; STEINESTEL *et al.*, 2015). Na técnica de PCR o genoma do HPV é identificado por amplificação das regiões virais E6/E7 e L1. Ainda não se sabe realmente os mecanismos que levam ao câncer de pênis causado pelo HPV, mas acredita-se que

seja semelhante ao que acontece no carcinoma de colo uterino e vulva (SARKAR *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2003).

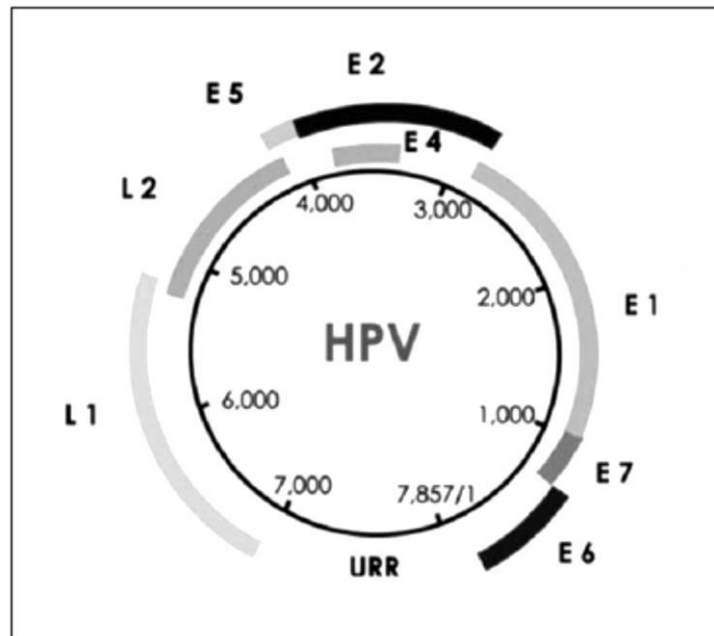


Figura 1. Representação esquemática do genoma do vírus HPV.
Fonte: Muñoz *et al.* (2006).

O mecanismo pelo qual o HPV pode promover o câncer de pênis parece estar mediado por dois genes virais, E6 e E7, que se ligam e inativam produtos de genes supressores de tumores, como proteína p53 (p53) e proteína do retinoblastoma (pRb), ambos responsáveis pelo controle negativo da proliferação celular (SAKAR *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2003; GANGULY & PARIHAR, 2009).

A proteína E7 inibe a atividade da proteína supressora tumoral pRb, cuja função é a manutenção da célula em G1 através da formação de complexos estáveis com o fator de transcrição E2F. Assim, o fator de transcrição E2F fica livre para estimular a transcrição dos genes e promover a continuidade do ciclo celular no epitélio infectado (Figura 2). Como consequência da inativação da pRb ocorre, por feedback negativo, o aumento da expressão da proteína p16^{INK4a}, uma proteína inibidora das ciclinas quinases dependentes (CDKI), que inibe as ciclinas quinases dependentes 4 e 6 tentando bloquear o ciclo, mas o feedback não funciona, pois, a proliferação das células infectadas não depende das CDK, causando acúmulo de p16^{INK4a} na célula infectada (VOUSDEN,

1993; KUMAR *et al.*, 2010; KLAES *et al.*, 2001; GANGULY & PARIHAR, 2009; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

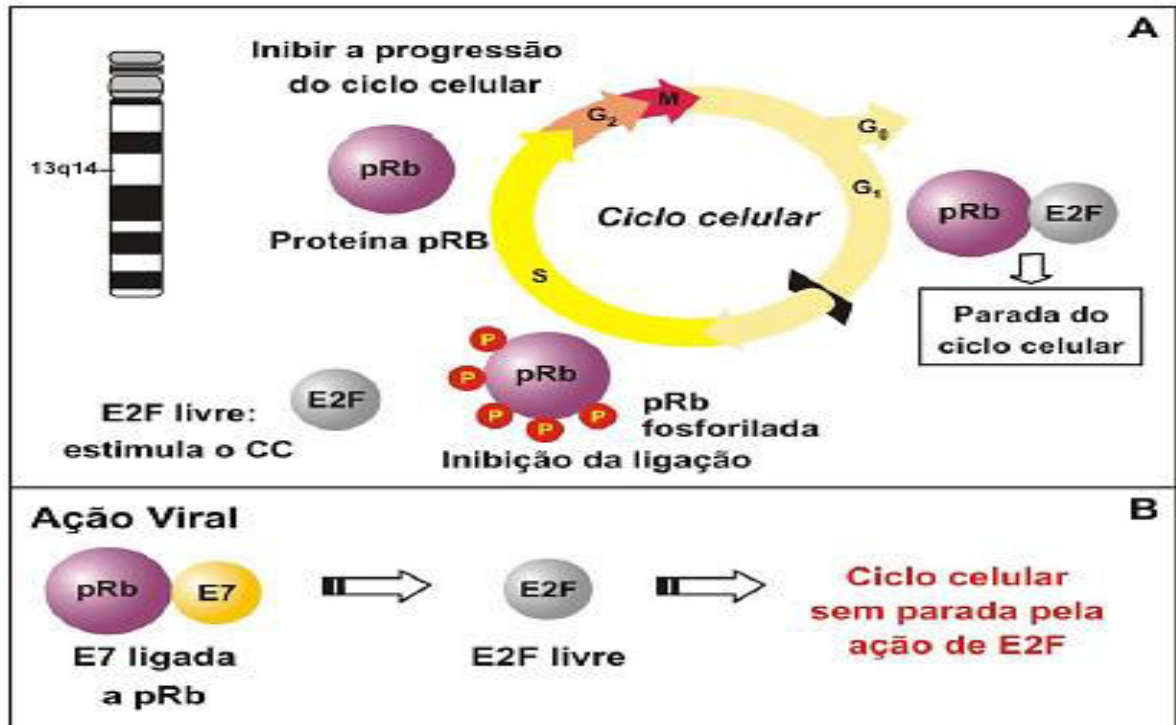


Figura 2. Ação da proteína pRb sobre o ciclo celular. (A) A proteína pRb é codificada pelo gene RB1, localizado no cromossomo 13q14. A ligação da proteína pRb ao fator de transcrição E2F resulta na parada do ciclo celular. A fosforilação da proteína pRb libera E2F que ativa a transcrição de genes alvo para replicação do genoma. (B) A proteína viral E7 se liga a pRb, isso libera o E2F, causando em estímulo constante para divisão celular.

Fonte: Silva, Amaral e Cruz (2017).

Já a E6 é capaz de ligar-se e gerar a degradação da proteína p53, sendo esta responsável por fazer um *checkpoint* na molécula de DNA para detectar danos, causando a perda da capacidade da célula reparar os possíveis danos do DNA e de promover apoptose em células com DNA danificados, levando assim a divisão celular sem reparo aumentando as chances da célula se tornar neoplásica (Figura 3) (GANGULY & PARIHAR, 2009).

Dessa forma, proteínas virais E6 e E7 do HPV de alto risco incapacitam duas proteínas supressoras tumorais importantes que regulam o ciclo celular e, como resultado, tem-se distúrbio da via p16^{INK4a}/ciclinaD/pRb e p14/MDM2/p53, o que

gera acumulação de p16^{INK4a} em células infectadas pelo HPV (WROCLAWSKI & SERPA NETO, 2010, p. 412).

Assim, o vírus HPV pode induzir a formação de câncer, atuando na modificação dos mecanismos de controle e reparo do ciclo celular (MÜNGER *et al.*, 2004; CAMARA *et al.*, 2008).

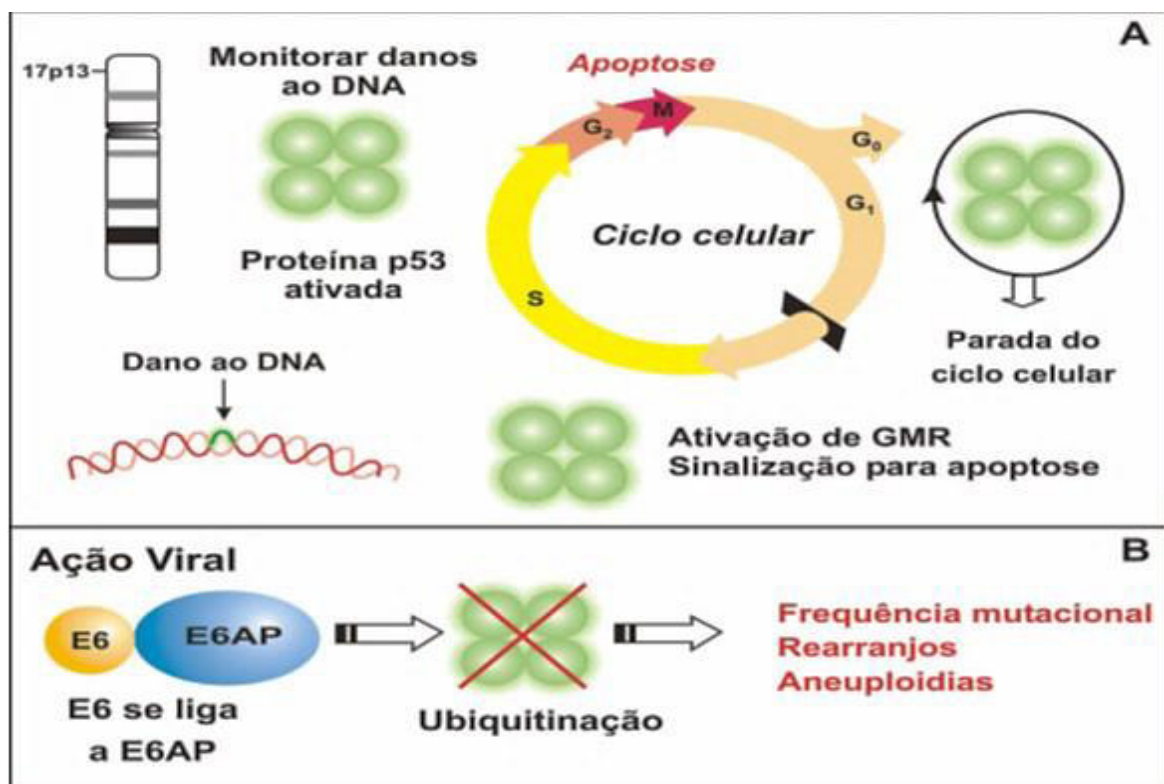


Figura 3: Ação da proteína p53 sobre o ciclo celular. (A) A proteína p53 é codificada pelo gene p53 localizado no cromossomo 17p13. A proteína p53 tem a função de para o ciclo celular no caso de identificação de danos ao DNA, dessa forma o ciclo para até que o dano seja resolvido. No caso de danos extensos a p53 pode induzir a apoptose. (B) A proteína viral E6 se liga à E6AP que funciona como uma ubiquitina, degradando p53. GMR: Genes do mecanismo de reparo.

Fonte: Silva, Amaral e Cruz (2017).

A coloração imuno-histoquímica pode detectar a superexpressão de p16^{INK4a}, exibindo coloração nuclear e citoplasmática contínua de todo o epitélio, e isto pode servir como um marcador para a infecção por HPV transcricionalmente ativa (WERNESSE, LEVINE & HOWLEY, 1990; MANNWEILER *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Associar a expressão da proteína p16^{INK4a} a fatores histológicos e ao status do vírus HPV no câncer de pênis.

3.2. Objetivos específicos

- ✚ Caracterizar os pacientes quanto aos dados sociodemográficos, clínicos e histológicos.
- ✚ Avaliar a expressão imunohistoquímica da proteína p16^{INK4a} entre os casos HPV + e HPV –, identificados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR;
- ✚ Analisar se há associação da superexpressão da proteína p16^{INK4a} ao status do vírus HPV.
- ✚ Analisar se há associação da superexpressão da proteína p16^{INK4a} com as características histológicas do câncer de pênis.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental do tipo transversal prospectivo.

4.2. Período e local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica do Hospital Universitário Presidente Dutra (LIME-HUPD) e no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) no período de 2014 a 2016.

4.3. Amostragem do estudo

Foram analisados para este estudo 55 casos de pacientes que apresentaram diagnóstico de Carcinoma de Pênis, todos comprovados por diagnóstico anatomopatológico, e submetidos a

procedimento cirúrgico no Hospital Universitário Presidente Dutra e Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo no período de 2014 a 2016.

4.4. Coleta de dados

Os dados foram coletados a partir de entrevista com os pacientes, da análise dos laudos histopatológicos e dos prontuários dos pacientes com diagnóstico de Carcinoma de Pênis. Também foram selecionadas amostras de tecidos tumorais emblocados em parafina para realização da técnica de imunohistoquímica e tumor a fresco para técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4.5. Etapas do Estudo

Entrevista com pacientes e coleta do tumor a fresca

Quando pacientes eram diagnosticados com câncer de pênis e tinham cirurgia marcada, nossa equipe de pesquisadores era avisada da data e horário da cirurgia, e um dos pesquisadores iam para o hospital na data prevista da cirurgia para coleta do material a fresca e realização da entrevista através de um formulário previamente estruturado (Apêndice B), antes ou após o procedimento cirúrgico.

Análise dos laudos histopatológicos

Foi realizado uma análise de cada laudo dos casos de pacientes com diagnóstico de Carcinoma de Pênis no Serviço de Patologia do Hospital Universitário Presidente Dutra e do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo.

Análise dos prontuários

Foi realizada uma análise dos prontuários de pacientes com laudo histopatológico para Carcinoma de Pênis do Hospital Universitário Presidente Dutra e Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo para levantamento de dados demográficos, clínicos e laboratoriais.

Análise das lâminas

As lâminas dos casos levantados foram reavaliadas por um patologista para confirmação do diagnóstico e classificação histopatológica mais detalhada do carcinoma peniano de cada paciente. A partir da revisão das lâminas, foi selecionada uma lâmina de cada caso, contendo a lesão em estudo, para a posterior realização da técnica de imunohistoquímica.

As lâminas foram analisadas no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica do Hospital Universitário Presidente Dutra (LIME-HUPD).

Realização da imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada para avaliar a expressão da proteína p16^{INK4a} em cada caso.

Análise molecular do HPV

Para qualificar as amostras de câncer de pênis quanto à presença ou ausência de DNA de Papiloma Vírus Humano (HPV) foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas, do tipo *nested*. Para amostras positivas para presença do vírus HPV foi realizada a genotipagem do HPV a partir da reação de sequenciamento com o Kit ET Dye Terminator Cycle Sequencing.

4.6. Identificação histológica do HPV

O diagnóstico histológico do HPV foi definido pela presença coilocitose, sendo três critérios obrigatórios: a) halo perinuclear; b) atipia nuclear; c) binucleação (Figura 01). Para aumentar fidedignidade dos parametros histológicos, é protocolo do nosso serviço a inclusão completa da penectomia (incluindo prepucio), exceto nos casos com mais de 50 cassetes. O exame macroscópico e a avaliação histopatológica foi realizada por uropatologista com 15 anos de experiência (GEBS), o qual revisou todas as lâminas e desconhecia o resultado molecular da pesquisa do HPV. E para classificar o estadiamento tumoral foi utilizado a *7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual* (EDGE et al., 2010).

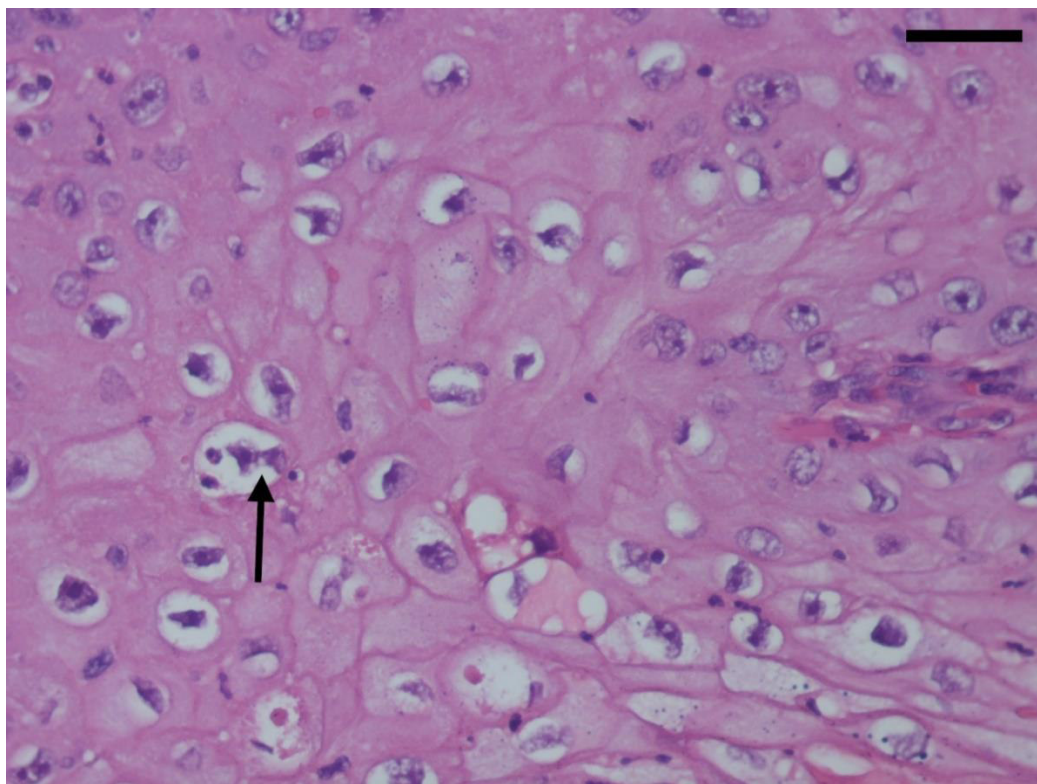


Figura 4: Histopatológico do tecido de pênis do paciente, corado por Hematoxilina-Eosina. A presença de coilocitose está indicada pela seta. Aumento de 1000x.

4.7. Técnica de imunohistoquímica (IHQ)

A técnica utilizada foi baseada no método indireto de marcação com Polímeros. Em todas as reações realizadas acrescentou-se um tecido-controle positivo representado por carcinoma de pênis condilomatoso ao qual manteve o mesmo padrão de marcação em todas as imunohistoquímicas.

Após a escolha do material parafinizado de cada caso, através da revisão de lâminas, secções histológicas de 3 μ m de espessura foram colocadas sobre lâminas silanizadas (StarFrost). As lâminas foram dispostas em estufa com temperatura de 60°C. Após foram realizados os seguintes passos:

DESPARAFINIZAÇÃO: as lâminas foram imersas em xilol para a retirada da parafina e reidratadas com banhos de álcool com concentrações decrescentes. Depois foram lavadas em água corrente e destilada durante 5 minutos.

RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA: as lâminas foram inseridas em cubetas de material resistente acrescidas de solução tampão, a fim de conservar o material durante o processo de recuperação antigênica. O tampão utilizado foi EDTA pH 8,0. As cubetas foram colocadas em aparelho de aquecimento a vapor (Steamer) para realização da recuperação antigênica a temperatura de 100°C por 60 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente por 20 minutos, as lâminas foram lavadas com solução de PBS (NaCl 0,15M, tampão fosfato 0,01M, pH 7,4).

BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA: As lâminas foram lavadas com PBS pH 7,4 e dispostas em bandejas específicas para o prosseguimento do experimento, sendo estas previamente umedificadas com papel de filtro embebido em água destilada. Durante o processo de disposição das lâminas na bandeja foi utilizada, quando necessário, solução de PBS pH 7,4 para evitar que os cortes secassem. Após foi retirado o excesso de PBS, com devido cuidado em relação aos cortes histológicos e, em seguida, os mesmos foram delimitados com caneta hidrofóbica a fim de proporcionar melhor exposição aos reagentes aplicados na lâmina evitando a dispersão dos mesmos. A seguir, realizou-se o bloqueio da enzima endógena peroxidase com solução de peróxido de hidrogênio (Spring) que foi adicionado às lâminas durante 10 minutos. Após o tempo previsto as lâminas foram lavadas três vezes com solução de PBS pH 7,4.

BLOQUEIO DA ENZIMA ENDÓGENA BIOTINA (PROTEÍNA A): Adicionou-se às lâminas previamente lavadas com PBS pH 7,4 a solução de bloqueio proteína A (Spring) durante 10 minutos, após o tempo previsto as lâminas não foram lavadas.

APLICAÇÃO DO ANTICORPO PRIMÁRIO: foi aplicado quantidade suficiente do Anticorpo Primário Monoclonal de Rato p16^{INK4a} Clone G175-405 (Zeta, Arcadia, CA, USA) diluído numa proporção de 1:75µc com diluente BSA 0,01%. O tempo de incubação foi de 1 hora e 45 minutos em câmara úmida para o p16^{INK4a}, as lâminas foram devidamente lavadas com solução de PBS pH 7,4 por três vezes.

AMPLIFICAÇÃO: a amplificação da expressão do anticorpo primário foi feita utilizando o método indireto através do uso de Polímeros (Spring), que foram aplicados aos cortes em quantidades suficientes para reagir em todo o material fixado na lâmina, por um tempo de 30 minutos. Após o período foi realizada a lavagem com PBS pH 7,4 por três vezes.

REVELAÇÃO: as reações foram reveladas incubando-se cada corte durante 5 minutos com quantidade suficiente do cromógeno (Kit DAB, Spring) diluído numa proporção de 50:1000 μ c. Após o tempo de exposição, as lâminas foram lavadas com água destilada e posteriormente com água corrente em abundância. Os resíduos do cromógeno utilizado foram desprezados em recipiente específico para posterior tratamento e encaminhamento ao Laboratório de Resíduos Químicos da instituição.

CONTRACOLORAÇÃO E MONTAGEM: a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (MERCK KgaA Darmstadt, Germany). Os cortes foram desidratados em soluções de álcool e xilol e, posteriormente, houve a adição de lamínulas de tamanho 24,0 x 32,0 mm se utilizando de meio de montagem rápida Entellan (MERCK KgaA Darmstadt, Germany).

QUANTIFICAÇÃO DA REAÇÃO: Para definição dos padrões de expressão da p16^{INK4a} foi utilizada uma adaptação da classificação do Cubilla *et al.* (2011), onde foi excluída a porção mais superficial do epitélio e utilizada a topografia de coloração (nuclear e citoplasmática), assim foram encontrados 4 padrões de expressão de p16^{INK4a} e foram categorizados como segue: Padrão 0, ausência completa de coloração em todas as células neoplásicas; Padrão 1, coloração individual manchada, irregular e descontínua em algumas das células neoplásicas; Padrão 2, um padrão de coloração mais extenso, embora descontínuo, com pequenos aglomerados de células neoplásicas positivas; E padrão 3, coloração citoplasmática e nuclear contínua e completa em todas as células neoplásicas. Quando mais de um padrão foi observado no mesmo tumor, o mais alto foi considerado como representativo de toda a lesão. Assim, apenas o padrão 3 foi considerado positivo para superexpressão de p16^{INK4a} (Figura 5).

4.8. Análise molecular do HPV

Para qualificar as amostras de câncer de pênis quanto à presença ou ausência de DNA de Papiloma Vírus Humano (HPV) inicialmente foi realizado a extração de DNA do tecido tumoral com fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Posteriormente foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas, do tipo *nested*. Na primeira PCR foi utilizado um conjunto de primers genérico denominados PGMY09/11, descrito por Gravitt *et al.* (2000) que produz um fragmento de 450pb da região L1 do HPV. O mix desta PCR teve volume total de 25µL, sendo a mistura constituída por 5µL de DNA genômico, 2,5 µL de tampão PCR 1X; 0,5 µL de MgCl₂; 0,2 µL de dNTPs; 0,2 µL de Taq DNA polimerase e 0,4 µL de cada primer. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 2min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95° C a 40 seg, anelamento dos primers a 55°C por 40 seg, extensão a 72°C por 40 seg, e uma extensão final de 72°C por 5min.

Na segunda PCR foi utilizado o primer GP5+/6+ (JACOBS *et al.*, 1997), gerando amplicon de 170pb, o qual também é correspondente à região L1 do capsídeo viral. O mix final é de 25 µL para cada amostra, sendo a mistura constituída por 5µL de produto amplificado da primeira PCR, 2,5 µL de tampão PCR 1X; 1,5 µL de MgCl₂; 1,0 µL de dNTPs; 0,3 µL de Taq DNA polimerase e 2,5 µL de cada primer. As ciclagens serão as seguintes: 94°C por 5 minutos, seguindo-se de 45 ciclos de 94°C por 45 segundos, 40°C por 1min e 72°C por 1min; e por fim 72°C por 10 minutos. E foi utilizado como controle um pool de células hela positivas para HPV 16. Os amplicons foram separados em gel de agarose a 1,5%, e submetidos a uma tensão constante de 90V por 40 min.

Para amostras positivas para presença do vírus HPV foi realizada a genotipagem do HPV a partir da reação de sequenciamento com o Kit ET Dye Terminator Cycle Sequencing, acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

4.9. Análise estatística

Os dados foram tabulados no Excel (Microsoft Office 2013) e analisados no SPSS V22. Foi realizado análise de frequência relativa e absoluta para verificar a distribuição das variáveis categóricas. Para análise da normalidade das variáveis quantitativas foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov, estas variáveis foram descritas na forma de média e desvio padrão. A

associação entre o status do HPV e expressão de P16^{INK4a} se deu pela aplicação do teste Qui-quadrado de Pearson. Foi considerado como nível de significância o $p \leq 0,05$.

4.10. Aspectos Éticos

Esta pesquisa está vinculada a um projeto maior intitulado “Análise clínico-epidemiológica, histológica e imunohistoquímica do câncer peniano no estado Maranhão” que foi submetido e aprovado pela Comissão Científica – COMIC - HUUFMA com o parecer nº 2457/2014-60 e ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/CEP-HUUFMA com parecer de aprovação de número: 1.093.435 e CAAE: 43774215.7.0000.5086 (Anexos A e B).

Esta pesquisa atende a normas para pesquisa com seres humanos, estabelecidas pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012), assim todos os participantes foram devidamente orientados e assinaram o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A).

5. RESULTADOS

Foram analisados 55 pacientes diagnosticados com câncer de pênis, tendo na data da intervenção cirúrgica média de idade de $61 \pm 17,87$ anos.

Os resultados de caracterização epidemiológica estão apresentados na tabela 3 abaixo:

Tabela 3: Caracterização sociodemográfica e clínica na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017.

		<i>FA</i>	<i>FR</i>
Estado civil	Casado/ União estável	44	80 %
	Solteiro	11	20 %
Ocupação	Pescador	5	9,1 %
	Lavrador	26	47,3 %
	Aposentado	11	20 %
	Outros	13	23,6 %
Grau de escolaridade	Analfabeto	17	30,9 %
	Nível fundamental	33	60 %
	Nível médio	5	9,1 %
Tabagismo	Sim	29	52,7 %
	Não	26	47,3 %
Fimose	Presente	40	72,7 %
	Ausente	15	27,3 %

FA: frequência absoluta; FR: frequência relativa.

A amostra é caracterizada na sua maioria por homens casados 44 (80%), lavradores 26 (47,3%), com nível fundamental completo 33 (60%) e tabagistas 29 (52,7%). Destes, a fimose esteve presente em 40 (72,7%), de acordo com o apresentado na tabela 3 acima.

As características histológicas do tumor estão demonstradas na tabela 4 abaixo:

Tabela 4: Distribuição das características histológicas na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017.

		<i>FA</i>	<i>FR</i>
Tipo histológico	Carcinoma epidermóide	55	100%
Subtipo do tumor	Usual	24	43,6 %
	Condilomatoso	17	30,9 %
	Basalóide	4	7,3 %
	Misto*	10	18,2 %
Topografia	Glande	25	45,4 %
	Glande e prepúcio	20	36,4 %
	Glande e corpo peniano	2	3,6 %
	Prepúcio	4	7,3 %
	Glande, prepúcio e corpo peniano	4	7,3 %
Tamanho do tumor	≤0,5 cm	1	1,9 %
	0,6 – 2cm	7	12,7 %
	2,1 – 5,0 cm	34	61,8 %
	≥ 5,1 cm	13	23,6 %
Invasão perineural	Presente	19	34,5 %
	Ausente	36	65,5 %
Invasão linfática	Presente	16	29,1 %
	Ausente	39	70,9 %
Coilocitose	Presente	41	74,5 %
	Ausente	14	25,5 %
Linfadenectomia	Presente	17	30,9 %
	Ausente	38	69,1 %

FA: frequência absoluta; FR: frequência relativa; *Misto: 3 usual e basalóide, 6 usual e condilomatoso, 1 usual e verrucoso; HPV: papiloma vírus humano.

Na tabela 4 acima, observa-se que o carcinoma epidermóide é 100% (55) prevalente na amostra. Dentre estes casos, 28 (50,9%) são dos subtipos de câncer que estão associados com a presença do HPV, o carcinoma condilomatoso, basalóide ou misto com componentes condilomatoso ou basalóide, e que o subtipo usual é o mais frequente com 24 (43,6%) casos. A região do pênis mais atingida pelas lesões tumorais é a glândula com 25 (45,4%) casos, seguida pela glândula e prepúcio com 20 (36,4%). O tamanho mais frequente do tumor variou entre 2,1cm a 5cm

(61,8%). As invasões, perineural e linfática, estiveram presentes em 19 (34,5%) e 16 (29,1%) casos, respectivamente. E de acordo com classificação histológica realizada, a amostra apresentou coilocitose positiva em 41 (74,5%) casos, com ausência de cirurgia de linfadenectomia em 38 (69,1%).

As características do estadiamento TNM, bem como a frequência absoluta e relativa da presença do DNA HPV e classificação de risco oncogênico do HPV estão demonstrados na tabela 5 abaixo:

Tabela 5: Distribuição das características do estadiamento TNM e do status da infecção do HPV na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017.

N 55		FA	FR
Estágio T	pTx	3	5,5 %
	pT1 a pT1a	8	14,5 %
	pT1b a pT3	44	80 %
Estágio N	pN0	1	1,8 %
	pN3	5	9,1 %
	pNx	49	89,1 %
Estágio M	pMx	55	100%
Grau do tumor	Grau 1	8	14,6 %
	Grau 2	34	61,8 %
	Grau 3	12	21,8 %
	Grau X	1	1,8 %
DNA HPV	HPV Positivo	49	89,1 %
	HPV Negativo	6	10,9 %
Genótipo HPV	Alto risco oncogênico	46	83,6 %
	Baixo risco oncogênico	3	5,5 %
	Sem HPV	6	10,9%

N: frequência absoluta; %: frequência relativa; Estágio T: tumor primário; Estágio N: linfonodos regionais; Estágio Metástase distante; DNA: ácido desoxirribonucleico; HPV: papiloma vírus humano.

Segundo o sistema TNM de estadiamento (EDGE, 2010), a tabela 5 acima demonstrou que o estadiamento patológico com maior potencial metastático (estágio de pT1b a pT3) foi observado

em 44 (80%) casos e 42 (76,4%) foram classificados como tumores grau 1 e 2. A presença do DNA HPV é frequente em 89,1% (49) da amostra, sendo destes, 83,6% (46) classificados como HPV de alto risco oncogênico (HR-HPV) e 5,5% (3) como HPV de baixo risco oncogênico (LR-HPV). A subtipagem genômica após a extração do DNA confirmou a presença do HR-HPV, o HPV-16, em 33 (60%) casos, sendo a maioria infecções monovíricas. Dentre os casos LR-HPV foram encontrados o HPV-11, HPV-6 e HPV-30.

O perfil imunohistoquímico da proteína p16 está apresentado em 4 padrões (Figura 5). O padrão 0 (A), significa negatividade da expressão de p16 nas células neoplásicas; o padrão 1 (B), significa uma coloração isolada das células neoplásicas; o padrão 2 (C), significa manchas presentes na maioria das células neoplásicas; e o padrão 3 (D), significa positividade expressão positiva de p16 nas células neoplásicas.

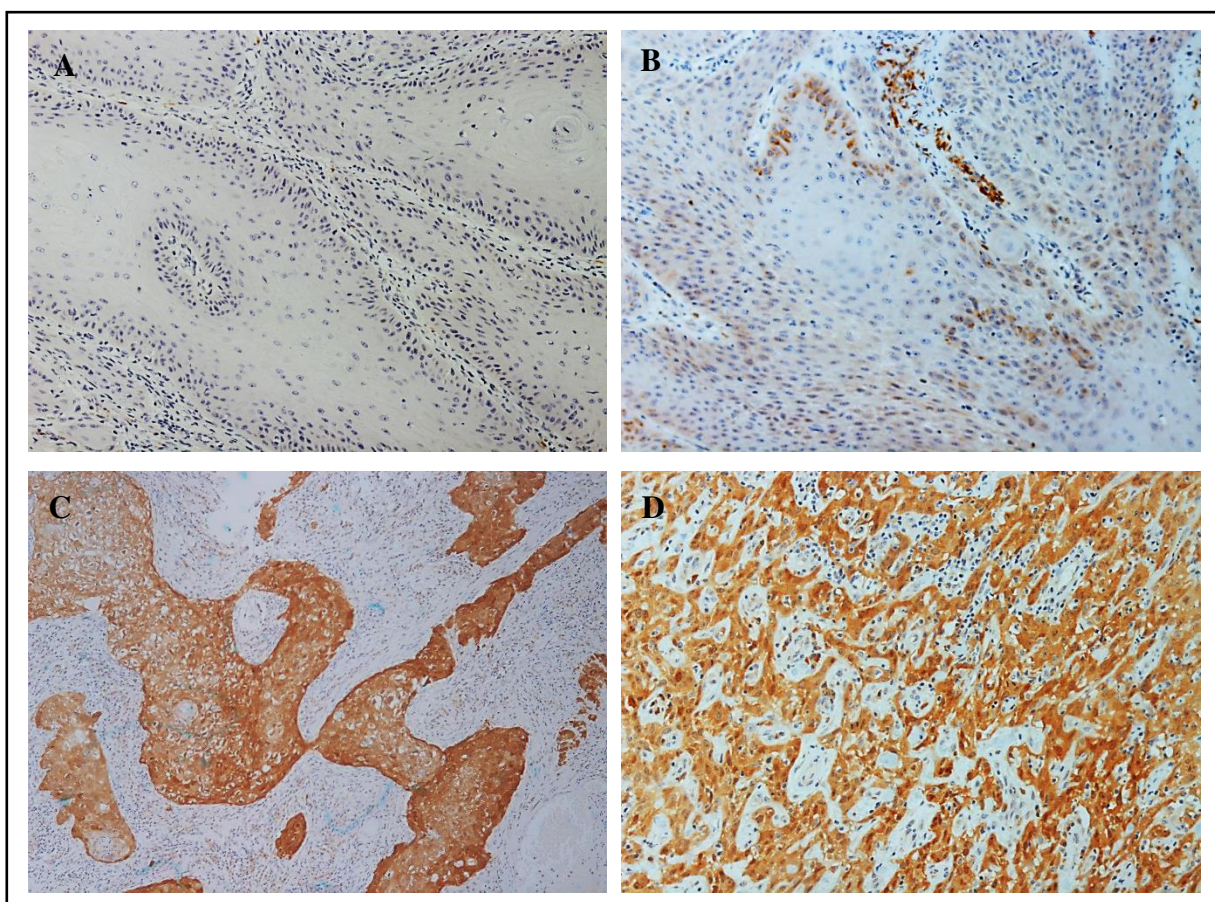


Figura 5: Padrões de expressão de p16^{INK4a} em carcinomas penianos. A, Padrão 0: Negatividade em todas as células neoplásicas. B, Padrão 1: células coradas isoladas. C, Padrão 2: mancha presente em algumas ou mesmo na maioria. D, Padrão 3: positividade em todas as células neoplásicas. Apenas o padrão 3 foi considerado para positividade de p16^{INK4a}.

A distribuição do perfil imunohistoquímico da proteína p16 está representada na tabela 6 abaixo:

Tabela 6: Perfil imunohistoquímico da proteína p16^{INK4a} na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017.

	Padrão de expressão	FA	FR
P16	0	5	9,1 %
	1	6	10,9 %
	2	22	40 %
	3	22	40 %

P16: Proteína p16^{INK4a}; N: Frequência absoluta; %: Frequência relativa. Padrão de expressão da p16: 0 – ausência de imunocoloração; 1 - imunocoloração manchada, irregular e descontínua; 2 - imunocoloração mais extensa, descontínua, pequenos aglomerados; 3 – coloração citoplasmática e nuclear contínua e completa.

Seguindo a classificação do Cubilla *et al.* (2011), para o padrão de expressão da proteína p16^{INK4a}, apenas 22 (40%) casos foram considerados p16^{INK4a} positivos (Tabela 6). Dentre os casos p16^{INK4a} positivos, 11 (50%) eram de carcinoma usual e os outros 11 (50%) eram basalóide, condilomatoso ou misto com componente condilomatoso ou basalóide. E o DNA HR-HPV esteve presente em 21 (95,5%) casos p16^{INK4a} positivo. Dentre os casos LH-HPV, apenas um foi considerado p16^{INK4a} positivo.

Na tabela 7, estão apresentados os resultados de associação da expressão de p16 com as características histológicas do tumor e status da infecção pelo HPV no câncer de pênis. Excluindo os casos LR-HPV das análises e considerando as características histopatológicas do carcinoma de pênis, houve associação da positividade da proteína p16^{INK4a} com o subtipo do tumor ($p = 0,036$), sendo que 100% dos carcinomas basalóides ou misto com características basalóides foram p16^{INK4a} positivos. Quando os carcinomas basalóides ou misto com características basalóides foram excluídos das análises a associação com a superexpressão da proteína p16^{INK4a} foi perdida. Em relação às outras características histológicas dos tumores, estas não foram significativamente associadas a p16^{INK4a}.

Tabela 7: Associação da proteína p16^{INK4a} às características histológicas e ao status da infecção pelo HR-HPV na série de 55 pacientes diagnósticos com câncer de pênis. São Luís, Maranhão, 2017.

N 55			
	P16 +	P16 -	Valor de p*
Subtipo do tumor			
Basalóide	4	0	0,036
Condilomatoso	3	12	
Misto	4	5	
Usual	10	14	
Tamanho do tumor			
≤ 2cm	2	6	0,335
> 2cm	19	25	
Estágio clínico			
Estagio 1	3	6	0,635
Estágio 2 a 4	18	25	
Fimose			
Presente	15	22	0,971
Ausente	6	9	
Grau histológico			
Grau X - 1	3	5	0,857
Grau 2 - 3	18	26	
Invasão linfática			
Presente	3	11	0,091
Ausente	18	20	
Invasão perineural			
Presente	4	12	0,132
Ausente	17	19	
Linfadenectomia			
Sim	5	12	0,284
Não	17	21	
DNA HPV			
HPV +	22	27	0,034
HPV -	0	6	

Genótipo HPV			
HR-HPV	21	25	
Sem HPV	0	6	0,032

HPV: Papiloma Vírus Humano; HR-HPV: HPV de alto risco oncogênico; P16 +: superexpressão da proteína p16^{INK4a}; p16-: ausência de superexpressão da proteína p16^{INK4a}; DNA: ácido desoxirribonucleico; HPV +: presença do DNA HPV; HPV -: ausência do DNA HPV; *: Grau de significância das associações realizados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson.

Quanto a associação do status da infecção pelo vírus HPV e a positividade da p16^{INK4a} podemos observar na tabela 7 que houve associação significativa entre a p16^{INK4a} e a presença do DNA HPV ($p = 0,034$), e com relação ao DNA HR-HPV, também houve associação significativa com a p16^{INK4a} ($p = 0,034$), sendo 21/46 casos de HR-HPV apresentando positividade para p16^{INK4a}.

6. REFERÊNCIAS

ABDULKADIR, S.A. *et al.* Tissue factor expression. And angiogenesis in human prostate carcinoma. *Human pathology*, v. 31, p. 443-7. 2000.

ARBYN, M. *et al.* EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease. *Int. J. Cancer*, v. 131, p. 1969-1982, 2012.

AUSTIN, P.F. Circumcision. *Curr. Opin. Urol.*, v. 20, n. 4, p. 318–22, 2010.

BAHMANYAR, E.R. *et al.* Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in Young adult women at enrolment in the multinational patricia trial. *Gynecology and Oncology*, v. 127, pág. 440-450, 2012.

BARBOSA JUNIOR, A.A; ATHANAZIO, P.R; OLIVEIRA, B. Câncer de pênis: estudo da sua patologia geográfica no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Saúde Publ.*, v.18, p.429-435, 1984.

BAROCAS, D.A.; CHANG, S. S. Penile cancer: clinical presentation, diagnosis, and staging. *The Urologic. Clinics. of North America*, v. 37, n. 3, p. 343–52, 2010.

BASU, P. *et al.* prevalence of hiht-risk human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasias in a previously unscreened population: a pooled analysis from thre estudies. *Int. J. Cancer*, v. 132, pág. 1693-1699, 2013.

BERNARD, H.U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal fo taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, pág. 70-9, 2010.

BETHUNE, G. *et al.* Clinical and pathologic factors of prognostic significance in penile squamous cell carcinoma in a North American population. *Urology* 2012, 79(5):1092-1097.

BEZERRA, A.L. *et al.* Human papillomavirus as a prognostic fator in carcinoma of the penis: alalysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*. v. 91, p. 2315-21, 2001.

BLEEKER, M.C. *et al.* Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World jornal of urology*, v. 27, p. 141-50, 2009.

BRANCA, M. *et al.* p16INK4A Expression Is Related to Grade of CIN and High-risk Human Papillomavirus but Does not Predict Virus Clearance After Conization or Disease Outcome. *International journal of gynecological pathology* 2004, 23(4):354-365.

BRASIL. Ministério da Saúde. Câncer no Brasil: dados de registros de base populacional. v. 3. - Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, 2012. *Diário Oficial da União*, Brasília: Distrito Federal, n. 12, p. 59, seção 1, 2013.

BRUMINI, R. Resultados. In: Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-80. Rio de Janeiro: Campanha Nacional de Combate ao Câncer: *Ministério da Saúde*, p. 118, 1982.

BURCHELL, N.A. *et al.* Capítulo 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, pág. 52-61, 2006.

CAMARA, G. N. N. D. L. *et al.* Os papilomavírus humanos – HPV: Carcinogênese e imunogênese. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 1, n. 1, p. 159–168, 2008.

CAROZZI, F. *et al.* Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 2013, 14(2):168-176.

CARVALHO, M. O. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA by the hybrid capture assay. *Brazilian Journal Infection Disease.*, n. 2, v. 7, pág. 121-125, 2003.

CASTELLSAGUÉ, X. *et al.* International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Male circumcision, penile human papillomavirus infection and cervical cancer in female partners. *N. Engl. J. Med.*, v. 346, p. 1105-1112, 2002.

CHAUX, A. *et al.* Distinctive Association of p16INK4a Overexpression With Penile Intraepithelial Neoplasia Depicting Warty and/or Basaloid Features: A Study of 141 Cases Evaluating a New Nomenclature. *Am. J. Surg. Pathol.*, v. 34, n. 3, March 2010.

CHAUX, A. *et al.* Warty basaloid carcinoma: clinic pathological features of a distinctive penile neoplasm: report of 45 cases. *Mod. Pathol.*, v. 23, p. 896-904, 2010.

CHRISTOULIDOU, M. *et al.* Epidemiology of penile cancer. *Curr Probl Cancer*, v. 39, p. 129-136, 2015.

CRAWFORD, L. V.; CRAWFORD, E. M. A comparative study of papyloma and papiloma viruses. *Virology*. v. 21, pág. 258 – 263, 1963.

CRUZ, M.R. *et al.* Prevalence of human papilomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; v. 99, p. 281-282, 2004.

CUBILLA, A. *et al.* Tumors of the penis. In: J. N. Eble; G. Sauter; J. I. Epstein; I. A. Sesterhenn (Eds.); *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. p.281–298, 2004.

CUBILLA, A.L. *et al.* Histologic classification of penile carcinoma and relation to outcome in 61 patients with primary resection. *Int J Surg Pathol*, v. 9, p. 111-120, 2001.

CUBILLA, A.L. *et al.* The basaloid cell is the best tissue marker for human papillomavirus in invasive penile squamous carcinoma: a study of 202 cases from Paraguay. *Am J SurPathol.* n. 1, v. 34, pág. 104-114, 2010.

CUBILLA, A.L. *et al.* The basaloid cell is the best tissue marker for human papillomavirus in invasive penile squamous cell carcinoma: a study of 202 cases from Paraguay. *The American journal of surgical pathology* 2010, 34(1):104-114.

CUBILLA, A.L. *et al.* Value of p16INK4a in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: a report of 202 cases. *The American journal of surgical pathology* 2011, 35(2):253-261.

CUBILLA, A.L. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World journal urology*, v. 27, p. 169-77, 2009.

CULKIN, D.J., BEER, T.M. Advanced penile carcinoma. *Journal of Urology*, v.170, p. 359-65, 2003.

CURADO, M.P.; EDWARDS, B.; SHIN, H.R. Cancer incidence in five continents. v. IX. *editora iarc scientific publications*, 2007.

DEEM, S. *et al.* Contemporary diagnosis and management of squamous cell carcinoma (SCC) of the penis. *BJU Int*, v. 108, n. 9, p. 1378-92, Nov 2011.

DILLNER, J. *et al.* Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* v. 205, p. 189-93, 2000.

DROLLER, M J. Carcinoma of the penis an overview. *Urol Clin North Am.*, v. 7, p. :783-4, 1980.

DUARTE FRANCO, E.F.E. Othergynecologiccancers: endometrial, ovarian, vulvar and vaginal cancers. *BMC Womens Health.* 2004.

EDGE, S.B. *et al.* The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, n. 6, v. 17; p.1471-1474, 2010.

FAVORITO, L. A. *et al.* Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *Int Braz J Urol*, n. 34, p. 587-93, 2008.

FAY, C.E.S. Avaliação da expressão imunoistoquímica do fator tecidual no carcinoma de pênis. Porto Alegre: PUCRS, 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciência da Saúde). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

FEDRIZZI, E. N.; SCHLUP, C. G.; MENEZES, M. E. Infecção pelo papilomavirus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis.* n. 2, v. 20, pág. 73-79, 2008.

FERNADES, J. V. *et al.* Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. *International Journal of Gynecology Obstetric*. v. 105, pág. 21-24, 2009.

FERRÁNDIZ-PULIDO C. *et al.* penile squamous cell carcinoma. *actas dermo-sifiliográficas*, v. 103, p. 478-487, 2012.

FERRÁNDIZ-PULIDO, C. *et al.* identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penil squamous cell carcinomas: correlation with pathologic subtypes, p16^{INK4a} expression, and prognosis. *Journal American of Academy of Dermatology*. 2013.

FERRAZ, Laís de Campos; SANTOS, Ana Beatriz Rossetti; DISCACCIATI, Michelle Garcia. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intra-epitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. *J Health Sci Inst*, São Paulo, v. 2, n. 30, p.107-111, dez. 2012.

FERREUX, E. *et al.* Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. *J Pathol*, v. 201, n. 1, p. 109-18, 2003.

FIQUEIROA, M. DAS N. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO CÂNCER DE PÊNIS E DOS MARCADORES TUMORAIS p53, TNF α , c-MYC, TOLL-LIKE E MMP-2. 2004, 91 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia, Campinas, 2014.

FONSECA, A. G. *et al.* Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saude*, v. 1, n. 2, p. 85-90, 2010.

FRANCESHI, S. *et al.* Prevalence and determinats of human ppillomavírus genital infection in men. *Brazilian Journal of Cancer*. V. 86, pág. 705-711, 2002.

GANGULY N, PARIHAR SP. Human papillomavirus E6 e E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.*, v. 34, p. 113-23, 2009.

GARCIA-CARRANCÁ A, GARIGLIO PV. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inv Clin*, v. 45, n. 1, p. 85-92, 1993.

GIL, A.O. *et al.* Analysis of the association between Human Papillomavirus with penile carcinoma. *Braz J Urol*, v. 27, n. 5, p. 461-468, 2001.

GIULIANO, A. R. *et al.* The human papillomavírus infection in men study: human papillomavírus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, México and United States. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevalence*. V. 17, pág. 2036-2043, 2008.

GREENBERG, R. E. Surgical management of carcinoma of the penis. *Urol Clin North Am*, v. 37, n. 3, p. 369-78, 2010.

GUNIA, S. *et al.* p16 INK4a is a Marker of Good Prognosis for Primary Invasive Penile Squamous Cell Carcinoma: A Multi-Institutional Study.. *The Journal of Urology*. v. 187, 2012.

HEYNS, C. F.; MENDOZA-VALDÉS, A.; POMPEO, A. C. L. Diagnosis and staging of penile cancer. *Urology*, v. 76, n. 2 Suppl 1, p. S15–23, 2010.

INCA - Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. TNM: classificação de tumores malignos. 6a ed. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2004.

INCA (2010). Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil.

INSTITUTO DO HPV. Guia do HPV: entenda de vez os papilomavírus humano, as doenças que causam e o que já é possível fazer para evita-los. 2013.

JACOBS, M.V. *et al.* A general primer gp5+/gp6(+)-mediated pcr-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal Clinical Microbiology*, v. 35, p. 791-795, 1997.

JOEL, W. *et al.* Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. *J Urol.*, v. 165, n. 5, p. 1138-42, 2001.

JORDAN, R.C. *et al.* Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *The American journal of surgical pathology* 2012, 36(7):945-954.

KAYES, O. *et al.* molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet oncology*, v. 8, n. 5, p. 420-429, 2007.

KLAES, R. *et al.* Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*, v. 92, p. 276-84, 2001.

KLAES, R. *et al.* p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *The American journal of surgical pathology* 2002, 26(11):1389-1399.

KUMAR, V. *et al.* Robbins: patologia básica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

LAWSON, J.S.; GLENN, W.K.; WHITAKER, N.J. Human papiloma viroses and breast cancer – assessment of causality. *Frontiers in Oncology*, v. 6, 2016.

LETO, M.G.P. *et al.* Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *Arquivos brasileiros de endocrinologia*. n. 2, v. 86, pág. 306-17, 2011.

LOPES, A. *et al.* Prognostic factors in carcinoma: of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. *J Urol.*, v. 156, p. 1637-41, 1996.

LUCIA, M.S.; MILLER, G.J. Histopathology of malignant lesions of the penis. *Urol Clin North Am.*, v. 19, p. 227-46, 1991.

LYNCH, D.F.; PETTAWAY, C.A. Tumors of the penis. In: WALSH, P.C. *et al.*, editors: *Campbell's Urology*, 8 ed., Philadelphia, 2002.

MADEN, C. *et al.* History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 1993.

MAJOR, T. *et al.* The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *Journal of Clinical Pathology*. v.58, p. 51–55, 2005.

MANNWEILER, S. *et al.* Two major pathways of penile carcinogenesis: HPV-induced penile cancers overexpress p16ink4a, HPV-negative cancers associated with dermatoses express p53, but lack p16ink4a overexpression. *J Am Acad Dermatol*, v. 69, n. 1, p. 73-81, 2013.

McCANCE D.J. *et al.* Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int J Cancer*, v. 37, p. 55-9, 1986.

MICALI, G. *et al.* Penile Cancer. *J Am Acad Dermatol*. v. 54, p. 369-391, 2006.

MORK, J. *et al.* Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The new england journal of medicine*. v. 344, p. 1125–1131, 2001.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K. M.; *et al.* Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of Virology*, v. 78, n. 21, p. 11451–11460, 2004.

MUÑOZ, N. *et al.* Capítulo 1: HPV in the etiology of human câncer. *Vaccine*. p. 1-10, 2006.

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. n. 6, v. 348, pág. 518-527, 2003.

NARDI, A.C. *et al.* Epidemiology and Natural History of Penile Cancer. In: POMPEO, A.C.L., HEYNS C.F., ABRAMS, P. Penile Cancer, (p. 3-14). *International Consultation on Penile Cancer*: Santiago, Chile, 2008.

NICOLAU, S.M. *et al.* Human papillomavírus DNA detection in male sexual partners of woman with genital human papillomavírus infection. *Urology*. V. 65, p. 251-255, 2005.

ORNELLAS, A.A.; BROWN, G.A. Câncer urológico (câncer de pênis). In: Ferreira C.C.; Roca J.C. *Oncologia molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004. P. 224-229.

PAIVA, G.R. Carcinoma de pênis: panorama da doença no estado da Bahia: considerações epidemiológicas e histopatológicas. 2010, 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia/ Fundação Oswaldo Cruz/Salvador/BA, 2010.

PARKIN, D.M. *et al.* Cancer incidence in five continents. Volume VIII. *IARC scientific publications*, v. 155, p. 1-781, 2002.

PATRIDGE, J.M.; KOUTSKY, L.A. Genital human papillomavírus infections in men. *Lancet infect disease*, v. 1, p. 21-31, 2006.

- PAULA, A.A.P. *et al.* Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n. 3, p. 243–252, 2005.
- PIZZOCARO, G. e. *et al.* Guidelines on penile cancer. *European Urology*, v. 47, p. 1-28, 2010.
- PLAUT, A.; KOHN-SPEYER, A.C. Carcinogenic action of smegma. *Science*, v. 105, p. 391-3, 1947.
- POMPEO, A. *et al.* Projeto Diretrizes Carcinoma do Pênis - Parte I. Rio de Janeiro: *Sociedade Brasileira de Urologia*, p. 18, 2006.
- POMPEO, A.C.L.; HEYNSCF, ABRAMS, P. Penile cancer - international consultation on penile câncer. *société internationale d'urologie (siu)*. *Urology*, v. 1076, p. s1-s73, 2010.
- POW-SANG, M. R. *et al.* Cancer of penis. *Canc. Contr. J.* n. 4, v. 9, p. 305-314, 2002.
- POW-SANG, M.R.; FERREIRA, U.; POW-SANG, J.M. Epidemiology and natural history of penile cancer. *Urology*, v. 76, p. 2-6, 2010.
- RAVI, R. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. *British journal of urology*, v. 72, p. 817-9.
- REIS, A.A. DA S. *et al.* Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 15, n. 1, p. 1105–1111, 2010.
- RIPPENTROP, J.M; JOSYN, S.A; KONETY, B.R. Squamous cell carcinoma of the penis. Evaluation of data from the surveillance, epidemiology, and results program. *Cancer*, v. 101, n. 6, p.1357-1362. 2004.
- ROUS, P.; KIDD, J.G. The carcinogenic effect of a papiloma vírus on the tarred skin of rabbits. *Journal Experimental Medicine*. n. 4, v. 68, 1938.
- ROYAL COLLEGE OF PATHOLOGISTS. Standards and Datasets for Reporting Cancers Datas et for penile cancer histopathology reports. London: *The Royal College of Pathologists*, 13 p, 2006.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2 ed. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.
- SARKAR, F.H. *et al.* Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. *J Urol.*, v. 147, p. 389, 1992.
- SCHEURER, M.E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention. *Int J Gynecol Cancer*, v. 15, p. 727-46, 2005.
- SCHIFFMAN, M. *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. v. 370, p. 890-907, 2007.

- SCHOEN, E.J. *et al.* The highly protective effect of newborn circumcision against invasive penile cancer. *Pediatrics*, v. 105, n. 3, p. 1-4, 2000.
- SENBA, M. *et al.* Detection of Human papillomavirus and cellular regulators p16INK4a, p53, and NF-kappaB in penile cancer cases in Kenya. *Acta Virol*, v. 53, n. 1, p. 43-8, 2009.
- SHEW, M. L. *et al.* High frequency of human papillomavirus detection in the vagina before first vaginal intercourse among females enrolled in a longitudinal cohort study. *The Journal of Infectious Diseases*. n. 6, v. 207, p. 1012-1015, 2013.
- SILVA, A.M.T.C. *et al.* Genotipagem de papiloma vírus humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente. *Rev Bras Cancerol.*, v. 49, p. 167-74, 2003.
- SILVA, A.M.T.C.; AMARAL, M.V.T.; CRUZ, A.D. DA. HPV e Câncer: O Papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v04/pdf/revisao4.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2017.
- SINGH, S.; JHONSON, J.; CHELLAPPAN, S. Small molecule regulators of Rb-E2F pathway as modulators of transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2010.
- SLATON, J.W. *et al.* Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. *The Journal of urology*, v. 165, p. 1138-42, 2001.
- SMITH, J. *et al.* Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *International Journal of Cancer*, v. 121, p. 621-632, 2007.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. SOLS. <http://www.sbu.org.br>. Acessado em 24/05/2016.
- SOLSONA, E. *et al.* Prospective validation of the association of local tumor stage and grade as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal lymph nodes. *J Urol.*, v. 165, p. 1506-9, .
- SOUSA, I.D.B DE. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. *Bmc Urology*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-6, 24 fev. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12894-015-0007-8>.
- SOUZA, K.W. DE *et al.* Estratégias de prevenção para câncer de testículo e pênis: revisão integrativa. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 45, n. 1, p. 277-282, 2011.
- STEENBERGEN, R.D. *et al.* HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Journal of Clinical Virology*. v. 32, p. 25-33, 2005.
- STEINESTEL, J. *et al.* The role of histologic subtype, p16^{INK4a} expression and presence of human papillomavirus DNA in penile squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2015.

- STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Cancer Biology*, v. 9, p. 379-386, 1999.
- SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology*. v. 32, pág. 59–66, 2005.
- TANG, D.H. *et al.* Lack of P16ink4a over expression in penile squamous cell carcinoma is associated with recurrence after lymph node dissection. *J Urol*, v. 193, p. 519-25, 2015.
- THEODORESCU, D. *et al.* Outcomes of initial surveillance of invasive squamous cell carcinoma of the penis and negative nodes. *J Urol*, v. 155, p. 1626-31, 1996.
- TORNESELLO, M.L. *et al.* Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2008.
- TORNESELLO, M.L. *et al.* Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *J Gen Viro*. v. 81, p. 2969-2982, 2000.
- TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006.
- VELAZQUEZ, E. F.; AYALA, G.; LIU, H.; *et al.* Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 32, n. 7, p. 974–9, 2008.
- VELAZQUEZ, E.F.; CUBILLA, A.L. Penile squamous cell carcinoma: anatomic, pathologic and viral studies in Paraguay (1993-2007). *Anal Quant Cytol Histol*. n. 4, v. 29, p. 185-198, 2007.
- VILLA, L. L.; LOPES, A. Human papillomavirus DNA sequence in penile carcinomas in Brazil. *International Journal of Cancer*. v. 37, pág. 853-855, 1986.
- VILLIERS, E. M. DE *et al.* Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet*. v. 2, p. 703 – 716, 1987.
- VOUSDEN, K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The Faseb Journal*, v. 7, p. 872-879, 1993.
- VUICHOU, C. *et al.* The Emerging Role and Promise of Biomarkers in Penile Cancer. *Urologic Clinics Of North America*, [s.l.], v. 43, n. 1, p.135-143, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2015.08.012>.
- WANG, S.S. *et al.* Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2004, 13(8):1355-1360.

WANICK, F.B.F. *et al.* Carcinoma epidermóide do pênis: estudo clínico-patológico de 34 casos. *An Bras Dermatol*, v. 8, n. 6, p. 1082-91, 2011.

WERNES, B.A.; LEVINE, A.J.; HOWLEY, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, v. 248, p. 76-9, 1990.

WHO/ ICO. HPV Information Centre. Human Papillomavirus and Related Cancers – Brazil, Summary Report 2009. Disponível em: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/BRA.pdf?CFID=4005139&CF_TOKEN=50211239>. Acessado em 21/08/2016.

WHO/ ICO. Information Centre on HPV and Cervical Cancer/ Latin America/ Brazil. Disponível em: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf>. Acesso em 08/08/2016.

WROCLAWSKI, M. L.; SERPA NETO, ARY. Biologia Molecular em Uro-oncologia. In: ZERATI FILHO, M; NARDOZZA JÚNIOR, A. Urologia fundamental. São Paulo: *Planmark*, p. 409-414, 2010.

ZEQUI, S. DE C. *et al.* Sex with Animals (SWA): Behavioral Characteristics and Possible Association with Penile Cancer. A Multicenter Study. *Journal of Sexual Medicine*, v. 9, n. 7, p. 1860–1867, 2012.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Current topics in microbiology and immunology. v. 78, p. 01 – 30, 1977.

7. ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

		UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA COMISSÃO CIENTÍFICA – COMIC – HUUFMA	
PARECER CONSUBSTANCIADO			
FINANCIAMENTO		NATUREZA DO PROJETO	
☐ Recurso Próprio ☒ Fomento ☐ Ind. Farmacêutica		☐ Graduação ☐ Especialização ☐ Mestrado ☐ Doutorado ☐ Serviço/HUUFMA ☒ Dep. Acadêmico ☐ Outros	
		Nº do Protocolo: 2457/2014-60 Data de Entrada no COMIC: 06/06/2014 Nº do Parecer: 058/2014 Parecer: APROVADO	

I - IDENTIFICAÇÃO:

Título: Análise Clínico-Epidemiológica, Histológica e Imunoistoquímica do Câncer Peniano no Estado Maranhão	
Pesquisador Responsável: Gyl Eanes Barros Silva	
Equipe Executora: Silma Regina Ferreira Pereira, José de Ribamar Calixto, Leudivan Ribeiro Nogueira, Fábio França Silva, Jaqueline Diniz Pinho, Hugo Eduardo Azevedo	
Unidade do HUUFMA onde será realizado: HUPD	
Sector de realização: LABORATÓRIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA MICROSCOPIA ELETRÔNICA	
Cooperação estrangeira: Sim () Não (X)	Multicêntrico: Sim () Não (X)

II – OBJETIVOS:

- **Geral:** Estudar as características clínicas, epidemiológicas, evolutivas, histológicas e o perfil imunoistoquímico do câncer de pênis no estado do Maranhão.
- **Específicos:**
 - Identificar o perfil clínico-epidemiológico de pacientes com câncer peniano atendidos nos Hospitais de Referência do Maranhão.
 - Correlacionar a expressão da Ciclina D1 com as variantes histológicas do Carcinoma de Pênis;
 - Identificar a presença de infecção por HPV, através dos marcadores tumorais p16 e p53;
 - Correlacionar a expressão de Ciclina D1 com as características clínicas e histopatológicas da amostra estudada;
 - Verificar o papel da Ciclina D1 como marcador prognóstico no Carcinoma de Pênis;
 - Avaliar a expressão de Ciclina D1 entre os casos HPV + (p16 e p53 positivos) e HPV - (p16 e p53 negativos);
 - Investigar se a expressão de Ciclina D1, p16 e p53, isoladamente ou em conjunto, pode ser um marcador de metástase linfonodal;
 - Correlacionar o índice de proliferação celular (Ki-67) com fatores prognósticos clássicos e com desenvolvimento de metástase linfonodal.

III – CRONOGRAMA: Setembro 2014 a dezembro 2016

IV - RESUMO DO PROJETO: O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos. No entanto, sua incidência é elevada em países em desenvolvimento, como o Brasil, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste. Em inquérito voluntário realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia foram comunicados 283 casos novos no Brasil em 2007. De acordo com a SBU, o Maranhão tem 10,7% dos casos de câncer de pênis notificados no Brasil, estando entre os cinco estados onde há maior prevalência, sendo superior até mesmo que o câncer de próstata. O estudo será realizado em duas etapas: O retrospectivo com análise de laudos histopatológicos, prontuários médicos, revisão de lâminas e reação imunoistoquímica no material arquivado em bloco de parafina no Serviço de Patologia do Hospital Universitário Presidente Dutra e Hospital Aldenora Belo, no período de janeiro de 2000 a abril de 2014 e prospectivo com coleta de dados clínicos-epidemiológicos, análise histológica e reação imunoistoquímica de novos casos no

período de setembro 2014 a dezembro de 2014. Os dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de imagem serão coletados por meio de investigação dos prontuários.

Estudo relevante considerando a alta prevalência no norte e nordeste do Brasil, destacando o Estado do Maranhão, com uma estimativa acima de 30 casos por ano, além do aspecto mutilante.

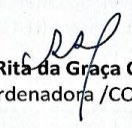
V - PARECER CONSUBSTANCIADO: APROVADO

O parecer **Aprovado** representa a autorização para a coleta de dados no âmbito do HUUFMA, fundamentado na Resolução 001/CAHU/UFMA e 03 de agosto de 2007 da constituição da Comissão Científica- HUUFMA.

VI - OBSERVAÇÃO:

- O início da coleta de dados está condicionado à aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa CEP/HUUFMA;
- A avaliação de projetos posteriores estará condicionada à entrega do relatório final (resumo e resultado, cópia em CD) da pesquisa anterior sob a responsabilidade do investigador principal.

São Luís, 14 de agosto de 2014


Profa. Dra. Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
Coordenadora /COMIC - HUUFMA

ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMIC



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA, HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO CÂNCER PENIANO NO ESTADO MARANHÃO

Pesquisador: Gyl Eanes Barros Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43774215.7.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.093.435

Data da Relatoria: 12/06/2015

Apresentação do Projeto:

O câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos. No entanto, sua incidência é mais elevada em países em desenvolvimento, como o Brasil, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste. No país, ele representa 2% de todos os casos de câncer no homem. A escassez de publicações reflete a baixa incidência da doença em países ricos, e consequentemente a maioria dos trabalhos é proveniente de instituições isoladas e com pequena casuística. Assim, muitas questões relevantes referentes à doença, inclusive manejo clínico e terapêutico, do câncer de pênis continuam em aberto. O câncer de pênis tem incidência aumentada a partir da sexta década de vida. Este tumor é infrequente em adultos abaixo de 30 anos, sendo raramente descrito em crianças. Noventa e cinco por cento das neoplasias que ocorrem no pênis são representadas pelo carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso (CEC); as restantes decorrem de metástases originadas em tumores de outros órgãos, representados pelos sarcomas, carcinoma basocelular e, muito raramente, melanomas. Em cerca de 70 a 80% dos pacientes que têm doença restrita ao pênis, a dor e sintomas sistêmicos são incomuns na apresentação inicial. O estadiamento do câncer peniano é importante, pois, além de orientar a conduta terapêutica, fornece informações sobre a probabilidade de cura e prognóstico. A Ciclina D1 é uma proteína nuclear de 35 KDa, codificada pelo gene CCND1 ou PRAD1, em referência ao achado de frequentes

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

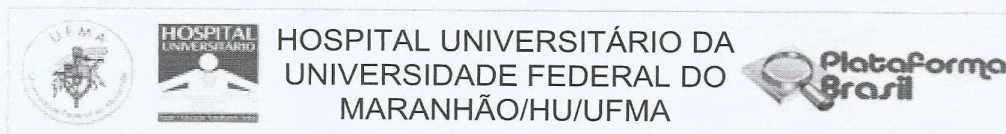
UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.093.435

rearranjos desse gene em adenomas da paratireoide, localizado no braço longo do cromossomo 11q13. Além de seu papel como protooncogene no ciclo celular, a Ciclina D1, como oncogene, atua na capacidade de invasão e potencial metastático através de interações entre a célula neoplásica e o microambiente tumoral. Em relação ao câncer de pênis, há apenas um trabalho na literatura que estudou a expressão de Ciclina D1. Os autores sugerem que a ciclina D1 parece atuar principalmente na promoção da proliferação de células, indicando seu potencial papel na patogênese do carcinoma peniano. No entanto, seus resultados não foram relevantes devido a baixa amostragem (21 casos) e, consequentemente, o baixo número de evolução desfavorável (morte, recorrência e metástases), decorrentes do diagnóstico mais precoce típico de países desenvolvidos. De acordo com a SBU, o Maranhão tem 10,7% dos casos de câncer de pênis notificados no Brasil, estando entre os cinco estados onde há maior prevalência, sendo superior até mesmo que o câncer de próstata. A etiologia é heterogênea. O estudo Clínico-Epidemiológico, Histológico e Imunohistoquímico dos espécimes cirúrgicos poderá trazer novas informações e aprofundar as já existentes sobre os tipos e evolução dos tumores, bem como os graus de estadiamento da doença, de modo a identificar o tipo histológico mais prevalente no Maranhão, e buscar entender determinantes na origem e evolução dessa patologia. Assim, os dados obtidos poderão subsidiar pesquisas em busca de marcadores diagnósticos, prognósticos e novas moléculas terapêuticas para essa patologia. Para a análise estatística, os dados serão analisados utilizando o programa Bioestat 5.0. As variáveis quantitativas serão analisadas através de frequências e porcentagens. Os dados epidemiológicos serão analisados EPINFO. Para as demais análises serão usados testes paramétricos sendo considerado o nível de significância quando $p < 0,05$. Fonte de financiamento: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (FAPEMA). Equipe executora: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva (pesquisador responsável), Prof^a. Dr^a. Silma Regina Ferreira Pereira, Prof. Dr. José de Ribamar Calixto, Leudivan Ribeiro, Msc. Fábio França Silva, Mestre, Msc. Jaqueline Diniz Pinho, Hugo Eduardo Azevedo.

Objetivo da Pesquisa:

Primário:

Estudar as características clínicas, epidemiológicas, evolutivas, histológicas e o perfil imunoistoquímico do câncer de pênis no estado do Maranhão.

Secundários:

- Correlacionar a expressão da Ciclina D1 com as variantes histológicas do Carcinoma de Pênis;
- Identificar a presença de infecção por HPV, através dos marcadores tumorais p16 e p53;

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA**



Continuação do Parecer: 1.093.435

- Avaliar a expressão da proteína Ciclina D1 no Carcinoma de Pênis através da técnica de imunoistoquímica;
- Correlacionar a expressão de Ciclina D1 com as características clínicas e histopatológicas da amostra estudada;
- Verificar o papel da Ciclina D1 como marcador prognóstico no Carcinoma de Pênis;
- Avaliar a expressão de Ciclina D1 entre os casos HPV + (p16 e p53 positivos) e HPV - (p16 e p53 negativos);
- Investigar se a da expressão Ciclina D1, p16 e p53, isoladamente ou em conjunto, pode ser um marcador de metástase linfonodal;
- Correlacionar o índice de proliferação celular (Ki-67) com fatores prognósticos clássicos e com desenvolvimento de metástase linfonodal;
- Implantação do primeiro ambulatório de referência do carcinoma de pênis do Brasil, no estado do Maranhão;
- Garantir acompanhamento ambulatorial adequado ao paciente acometido pelo câncer de pênis, por meio da atenção médica especializada e periódica;
- Rastrear, através de busca ativa no interior do estado, de possíveis casos de carcinoma de pênis e trazê-los ao ambulatório de referência para atendimento e tratamento especializado;
- Alertar a população maranhense quanto ao câncer de pênis, fatores de risco e suas complicações, por meio de ações educativas.
- Atender e tratar novos casos que surjam durante o período de realização do deste projeto, sejam eles oriundos do ambulatório de referência ou da busca ativa no interior do estado;
- Coletar material à fresco desses novos casos para posterior estudos genéticos e moleculares;
- Divulgar os resultados obtidos pelo referido projeto em congressos, revistas científicas e/ou outros meios científicos, visando expandir o debate sobre o tema e consequentemente, possibilitar o aumento das ações de prevenção de tal patologia e do acompanhamento adequado do paciente acometido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, este projeto confere riscos mínimos aos pacientes, uma vez que não será realizada nenhuma intervenção direta ou indireta para fins exclusivos desta pesquisa, mas somente aquelas previstas para o diagnóstico e tratamento dos sujeitos da pesquisa. As amostras biológicas a serem utilizadas serão provenientes de procedimentos cirúrgicos prescritos para os casos com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pênis. A coleta dos fragmentos de tumor não implicará em riscos adicionais no tratamento ou na cirurgia, e nem tampouco, em

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

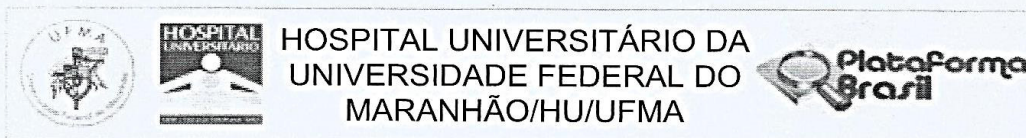
UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.093.435

aumento no tempo de operação ou extensão da mesma. Sob o aspecto emocional, os pacientes serão informados pela equipe médica, que sua participação na pesquisa não terá nenhuma influência sobre seu tratamento, de modo que eles devem se sentir livres para escolher entre participar ou não da pesquisa. Assim, é garantida a continuidade do acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação dos pacientes independentemente destes concordarem ou não em participar da pesquisa. Além disso, caso o paciente se sentir constrangido no momento da coleta a equipe médica sempre estará à disposição para que o participante se sinta à vontade. Considerando que o risco relaciona-se à quebra da confidencialidade, os pesquisadores se comprometem a manter sigilo das informações e guardar as mesmas em local seguro, de modo que, somente os pesquisadores ou o paciente terão acesso a estas informações. No que se refere aos benefícios, este trabalho deverá produzir resultados que não beneficiarão diretamente o sujeito da pesquisa, mas contribuirá para produção de conhecimento sobre a patologia para futuras investigações sobre possíveis marcadores de diagnóstico e prognóstico, o que muito contribuirá para o monitoramento e controle do câncer peniano na população. Os resultados obtidos nesta pesquisa serão comparados aos já existentes na literatura científica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho relevante, pois pretende estudar as características clínicas, epidemiológicas, evolutivas, histológicas e o perfil imunoistoquímico do câncer de pênis no Estado do Maranhão. Os resultados permitirão conhecer o perfil epidemiológico dos pacientes com câncer de pênis no Maranhão; conscientizar a população sobre a importância do autocuidado e do risco que o câncer de pênis representa; capacitar recursos humanos para realização de pesquisa científica de modo a implementar ações de prevenção, diagnóstico e tratamento de câncer peniano; além de caracterizar a via das ciclinas nos tumores penianos, relacionados ou não ao HPV, o que poderá ser utilizado como estratégia para o desenvolvimento de marcadores biológicos diagnósticos ou prognósticos mais precoces e específicos, evitando terapêuticas altamente mutilantes e com drásticas repercussões nas relações sociais e familiares dos pacientes. A metodologia está de acordo a que se propõe a pesquisa. A programação para o início da coleta de dados é posterior a avaliação do CEP/HUUFMA (junho a outubro/2015). O estudo apresenta riscos mínimos aos pacientes, uma vez que, não será realizada nenhuma intervenção direta ou indireta para fins exclusivos desta pesquisa, mas somente aquelas previstas para o diagnóstico e tratamento dos sujeitos da pesquisa; em relação à quebra da confidencialidade, os pesquisadores se comprometem a manter sigilo das informações e guardar as mesmas em local seguro, de modo que, somente os pesquisadores ou o paciente terão acesso a estas informações. Quanto aos

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1223 **E-mail:** cep@huufma.br



**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA**



Continuação do Parecer: 1.093.435

benefícios apresentados pelo pesquisador, os mesmos são indiretos, e estão relacionados ao acompanhamento futuro dos pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo cumpre com as exigências da Resolução CNS/MS nº 466/12 em relação aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Projeto de pesquisa original na íntegra, Declaração de compromisso em anexar os resultados na Plataforma Brasil garantindo o sigilo, Orçamento financeiro detalhado e Autorização do Gestor para a realização da coleta de dados.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA solicita que se possível os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente protocolo atende as exigências da resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares, estando APTO para a sua realização.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa—CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA



Continuação do Parecer: 1.093.435

SAO LUIS, 03 de Junho de 2015

Assinado por:

Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
(Coordenador)

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA
ELETRÔNICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÕES PARA OS PACIENTES, RESPONSÁVEIS E FAMILIARES

Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA, HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO CÂNCER PENIANO NO ESTADO MARANHÃO.**

Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender bem peça mais esclarecimento e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as suas dúvidas.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

O aparecimento de tumor no pênis é um fato não muito raro no Estado do Maranhão. Isso pode acontecer por diferentes motivos. Esta pesquisa tem como principal objetivo estudar as possíveis causas para o surgimento dessa doença, principalmente os aspectos relacionados com a presença do vírus HPV e alterações no tecido.

De que forma posso auxiliar neste estudo?

Você pode auxiliar autorizando que o material resultante da cirurgia para remoção do tumor e os resultados dos exames possam ser utilizados nesta pesquisa.

Quais os riscos e limites que podem ser encontrados nos exames?

O paciente não terá nenhum risco a mais, pois todo o procedimento cirúrgico será realizado conforme a prescrição médica.

Os resultados obtidos para essa pesquisa são absolutamente confidenciais, portanto, serão comunicados somente à pessoa ou responsável e ao profissional médico que acompanha o paciente.

A comunicação dos resultados a terceiros só poderá ser realizada mediante autorização do interessado.

É raro, mas é possível, que por problemas técnicos, o exame forneça resultados inconclusivos.

Como será feita esta pesquisa?

As pessoas serão convidadas a participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Os participantes serão atendidos pelo médico que fará algumas perguntas, examinará o paciente e, se necessário, poderá solicitar alguns exames complementares.

Quais os benefícios e malefícios deste estudo?

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração de qualquer ordem, com a participação neste estudo, porém, os resultados poderão ajudar a entender o porque e de que forma a doença apareceu e contribuirá futuramente para a melhoria do diagnóstico e tratamento dessa patologia.

O que vai ser feito com o material e os dados coletados de cada paciente?

O material e a ficha-protocolo com resultados dos exames dos pacientes serão armazenados no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica -HUUFMA - Universidade Federal do Maranhão (UFMA). As amostras serão registradas por números, para evitar identificação dos pacientes. A identificação dos pacientes será mantida em sigilo absoluto e estará sob a guarda dos pesquisadores responsáveis.

A pessoa ou responsável legal poderá escolher entre ser informado ou não dos resultados do estudo; aqueles que se interessar em saber sobre os resultados obtidos com o presente estudo serão orientados pela coordenadora geral do Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva (professor do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão), podendo ser contactado no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica – LIME – HUUFMA, no endereço: Av. Rua Barão de Itapary, nº 227, Centro - São Luís-MA. CEP: 65020-070. Os pacientes que não concordarem em participar da pesquisa não terão nenhum prejuízo sobre seu tratamento.

Declaro que fui devidamente esclarecido sobre a pesquisa da qual estou sendo convidado a participar, e que CONCORDO, voluntariamente, em participar do referido trabalho.

São Luís, _____ de _____ de 20____

NOME POR EXTENSO/RG

Assinatura

APÊNDICE B – ENTREVISTA ESTUDO DE CÂNCER DE PÊNIS NO MARANHÃO

ESTUDO DE CÂNCER DE PÊNIS NO MARANHÃO PROF. DR. GYL EANES BARROS SILVA

Pesquisador				Data	
CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS					
1) Número da peça					
2) Instituição					
3) Telefone					
4) Endereço					
5) Nome					
6) Idade					
7) Sítio(s) anatômico(s) do tumor		a) Glândula		b) Sulco coronal	
				c) Prepúcio	
8) Tamanho do tumor		7cm			
9) Número de secções					
10) Nível anatômico da invasão		Glândula	a) Lâmina própria	b) Corpo esponjoso	c) Túnica albugínea
		Prepúcio	a) Lâmina própria	b) Dartos	c) Corpo Cavernoso
11) Espessura do tumor		(Em mm)			
12) Tipo histológico		(Conforme OMS)			
13) Grau histológico		I		II	
14) Invasão vascular		Não			
15) Invasão perineural		Não			
16) Margens cirúrgicas		a) Uretra ou periuretral		b) Pele	c) Fáscia
17) Neoplasia peniana		a) Diferenciada		b) Verrucosa, basiloide, basiloide-verrucosa	
				c) Outra	
18) Líquen escleroso		a) Em tecidos adjacentes ao pênis		b) Em tecidos adjacentes ao câncer invasivo	
				c) No pênis	
CARACTERÍSTICAS SOCIOECONÔMICAS					
19) Residência		a) Urbana		b) Suburbana	
				c) Rural	
20) Formação educacional		a) Nenhuma		b) Primária	
				c) Secundária	
21) Renda familiar		a) menor que salário mínimo		b) maior que um salário mínimo	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS					
22) Tabagismo		a) Nega			
		b) Refere		b.1) Idade de início	
				b.2) Idade de término	
				b.3) Nº de cigarros/dia	
23) Características do prepúcio		a) Prepúcio longo			
		b) História de fimose			
		c) Circuncisão prévia			
		Idade:			
24) Verruga genital		a) Refere		b) Nega	
25) Higiene genital		a) Pobre/moderada		b) Boa	
26) História de DST		a) Refere		b) Nega	
27) História sexual		a) Idade do primeiro coito:			
		b) Nº de parceiras sexuais		b.1) Menor que 6	
				b.2) Entre 6 e 10	
				b.3) Maior que 10	
28) Prática de zoofilia		a) Refere		b) Nega	

9. PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

9.1. Nome do periódico com classificação na webqualis CAPES

Nome da revista: BMC Cancer.

Webqualis CAPES: A2 na medicina II.

9.2. Normas editoriais/ normas para autores

O artigo deve conter os seguintes tópicos: página de título, resumo, introdução, método, resultado, discussão, conclusão, lista de abreviação, declaração, notas finais e referências.

Folha de rosto: o título do artigo deve conter no máximo 15 palavras, se apropriado, o desenho do estudo; ainda nesta página dever ser listado o nome completo dos autores, descrevendo seus endereços institucionais e indicar o autor correspondente.

Resumo: o resumo não deve conter mais de 350 palavras, devendo descrever o contexto e proposta da pesquisa, bem como a redação objetiva do método, resultado e conclusão. Deve-se escolher entre três e dez palavras – chave que representem o conteúdo principal do artigo.

Introdução: Nesta seção deve ser descrito de maneira objetiva o que se sabe sobre o objeto de pesquisa, apontando o que existe na literatura e o porquê desse estudo ser necessário.

Método: esta seção deve incluir o objetivo; o design e a configuração do estudo; as características dos participantes e a descrição dos materiais; uma descrição clara de todos os processos, intervenções e comparações; o tipo de análise estatística utilizada.

Resultado: neste item deve ser descrito os resultados das análises estatísticas, que devem ser incluídas no texto ou como tabelas e figuras.

Discussão: esta seção deve discutir as implicações das descobertas no contexto da pesquisa existente e destacar as limitações do estudo.

Conclusão: aqui, deve-se indicar claramente as principais conclusões e fornecer uma explicação sobre a importância e relevância do estudo relatado.

Lista de abreviações: Se as abreviações forem usadas no texto, elas devem ser definidas no texto no primeiro uso, e uma lista de abreviaturas deve ser fornecida.

Declarações: Todos os manuscritos devem conter as seguintes seções sob o título "Declarações": aprovação ética e consentimento para participar, consentimento para publicação, disponibilidade de dados e material, interesses competitivos, financiamento, contribuições dos autores, reconhecimentos e informação dos autores (opcional).

Notas finais: As notas de fim devem ser designadas dentro do texto usando uma letra minúscula com letras sobrescritas e todas as notas (juntamente com a letra correspondente) devem ser incluídas na seção notas finais. Formate esta seção em um parágrafo e não em uma lista.

Referências: Todas as referências, incluindo URLs, devem ser numeradas consecutivamente, entre colchetes, na ordem em que são citadas no texto, seguindo de qualquer tabela ou legenda. Os números de referência devem ser finalizados e a lista de referência totalmente formatada antes da submissão.

9.3. Artigo

EXPRESSÃO DA P16^{INK4a} EM PACIENTES COM CÂNCER DE PÊNIS: UM ESTUDO PROSPECTIVO

Vicenilma de Andrade Martins^{1*}, Jaqueline Diniz Pinho²; Antônio Augusto Lima Teixeira Júnior³; Leudivan Ribeiro Nogueira⁴, Fabio França Silva⁵, André Salim Khayat ⁶, Jose de

Ribamar Rodrigues Calixto⁷, Silma Regina Ferreira Pereira⁸, Herikson Araújo Costa⁹, Leandra Naira Zambelli Ramalho¹⁰, Gyl Eanes Barros Silva¹¹.

*Correspondência: vicensilma@hotmail.com

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto e da Criança (PPGSAC), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Brasil.

²Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brasil. E-mail: jack-gene@hotmail.com.

³Graduando em Biologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Brasil.

⁴Médico, Urologista do Instituto Aldenora Belo (IMOAB), São Luís, Brasil.

⁵Doutorando do Programa Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil.

⁶ Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brasil.

⁷Departamento de Medicina II, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Brasil.

⁸Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Brasil.

⁹ Departamento de Educação Física, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Pinheiro, Brasil.

¹⁰ Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brasil.

¹¹Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto e da Criança (PPGSAC), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Brasil.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo HPV é descrita na literatura em 30-50% dos casos de câncer de pênis. A expressão imunohistoquímica de p16^{INK4a} é utilizada como indicativo da presença de HPV e marcador prognóstico para carcinomas escamosos de vários sítios. No entanto, seu papel no carcinoma de pênis ainda não está totalmente elucidado. O objetivo do estudo foi analisar, de forma prospectiva, se a expressão de p16^{INK4a} está associada a presença de HPV e parâmetros histológicos no câncer de pênis.

Métodos: Estudo prospectivo realizado no período de 2014 a 2016 com 55 casos de pacientes com carcinoma pênis. Foi realizada a detecção do DNA HPV por PCR em tecido tumoral a fresco e a imunohistoquímica para análise da proteína p16^{INK4a} em tecido parafinado. A avaliação de parâmetros histológicos foi realizada após inclusão total do tecido tumoral.

Resultados: O DNA HPV (genótipos de baixo risco e alto risco) foi encontrado em 49 (89,1%) casos, sendo 46 (83,6%) HR-HPV. Dos 22 casos p16^{INK4a} positivo, o DNA HR-HPV esteve presente em 21 (95,5%) deles ($p = 0,032$). Em relação a parâmetros histológicos, a p16^{INK4a} e o HR-HPV foram significativamente associados apenas ao subtipo do tumor ($p = 0,036$ e $p=0,032$, respectivamente), sendo que todos os carcinomas com características basalóides foram p16^{INK4a} positivo.

Conclusões: Utilizando amostra de tecido a fresco, a nossa casuística mostrou a mais alta incidência de HPV da literatura. A expressão da proteína p16^{INK4a} foi significativamente associada à presença do vírus HPV de alto risco oncogênico e pode servir como marcador da presença desse vírus. A proteína p16^{INK4a} não foi associada aos parâmetros prognósticos histológicos, exceto ao subtipo do tumor.

Palavras-chave: *Papillomaviridae*; Neoplasias Penianas; p16^{INK4a}.

ABSTRACT

Introduction: Infection by HPV is described in the literature in 30-50% of cases of penile cancer. The immunohistochemical of p16^{INK4a} is used as an indication of the presence of HPV and prognostic marker for squamous carcinomas various sites. However, its role in penile carcinoma has not yet been completely elucidated. The aim of the study was to prospectively analyze whether the expression of p16INK4a is associated with the presence of HPV and histological parameters in penile cancer.

Method: A prospective study was conducted in the period 2014 to 2016 with 55 cases of patients with penile carcinoma. HPV DNA was detected by PCR in fresh tumor tissue and immunohistochemistry for analysis of p16INK4a protein in paraffin waxed tissue. The evaluation of histological parameters was performed after total inclusion of the tumor tissue.

Results: HPV DNA (low-risk and high-risk genotypes) was found in 49 (89.1%) cases, 46 (83.6%) HR-HPV. Of the 22 p16INK4a positive cases, HR-HPV DNA was present in 21 (95.5%) of them ($p = 0.032$). Regarding histological parameters, p16INK4a and HR-HPV were significantly associated only with the tumor subtype ($p = 0.036$ and $p = 0.032$, respectively), being that, all carcinomas with basaloid characteristics were positive p16INK4a.

Conclusion: Using a fresh tissue sample, our sample showed the highest incidence of HPV in the literature. Expression of the p16INK4a protein was significantly associated with the presence of high oncogenic HPV virus and may serve as a marker for the presence of this virus. The p16INK4a protein was not associated with the histological prognostic parameters, except for the tumor subtype.

Keywords: Papillomaviridae; Penile Neoplasms; p16INK4a.

Introdução

O câncer de pênis (CP) é considerado uma neoplasia rara em países desenvolvidos [1, 2]. Entretanto, nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul é considerado um problema de saúde pública [3-5]. Dados nossos ainda não publicados, demonstram que a região nordeste do Brasil, particularmente o Estado do Maranhão, apresenta a maior incidência de CP já registrada no mundo.

Dentre os diversos fatores de risco para o desenvolvimento do CP, a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) é apontada na literatura como um dos fatores mais associados. A incidência de infecção pelo HPV em carcinoma peniano varia de 30% a 50% [6-10], principalmente os subtipos de alto risco oncogênico [6, 11-13]. Entretanto, os mecanismos biomoleculares da associação do HPV com o CP não estão totalmente elucidados. Acredita-se que sejam semelhantes aos que acontecem no carcinoma de colo uterino e vulva, onde as proteínas virais E6 e E7 se ligam e inativam produtos de genes supressores de tumores como proteína p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), ambos responsáveis pelo controle negativo da proliferação celular [14, 15]. A proteína E7 inibe a atividade da pRb deixando o fator de transcrição E2F livre desencadeando o processo de replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), resultando em uma superexpressão de proteína p16^{INK4a} por feedback negativo nas células infectadas [16, 17].

A expressão imunohistoquímica de p16^{INK4a} é frequentemente utilizada como marcador substituto para presença de HPV de alto risco oncogênico (HR-HPV) em neoplasias cervicais e carcinoma de células escamosas em outros órgãos [18-20]. Ela também tem sido utilizada para auxiliar no diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau, para prever a progressão ou regressão da neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau e como marcador de melhor sobrevivência específica no câncer (CSS) [21-25]. Entretanto, sabe-se pouco a respeito da associação da infecção por HPV com a expressão de p16^{INK4a} em pacientes com CP. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar, pela primeira vez de forma prospectiva, se há associação entre a expressão da proteína P16^{INK4a} com: 1) Parâmetros histológicos presentes em tumores que foram totalmente incluídos em parafina; 2) a presença do HPV em pacientes com câncer de pênis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de estudo prospectivo, onde foram analisados 55 casos de pacientes que apresentaram diagnóstico de Carcinoma de Pênis, todos comprovados por diagnóstico anatomopatológico e submetidos a procedimento cirúrgico no Hospital Universitário Presidente Dutra ou no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo no período 2014 a 2016.

Os dados foram coletados a partir de entrevista com os pacientes, da análise dos laudos histopatológicos e da revisão dos prontuários dos pacientes com diagnóstico de Carcinoma de Pênis. Também foram selecionadas amostras de tecidos tumorais emblocados em parafina para realização da técnica de imunohistoquímica e tumor a fresco para técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Identificação histológica do HPV e outros parâmetros histológicos

O diagnóstico histológico do HPV foi definido pela presença de coilocitose, sendo três critérios obrigatórios: a) halo perinuclear; b) atipia nuclear; c) binucleação (Figura 01). Para aumentar fidedignidade dos parâmetros histológicos, é protocolo do nosso serviço a inclusão completa da penectomia (incluindo prepúcio), exceto nos casos com mais de 50 cassetes. O exame macroscópico e a avaliação histopatológica foi realizada por uropatologista com 15 anos de experiência (GEBS), o qual revisou todas as lâminas e desconhecia o resultado molecular da pesquisa do HPV. E para classificar o estadiamento tumoral foi utilizado a *7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual* [26].

Análise Molecular do HPV

Para qualificar as amostras de CP quanto à presença ou ausência de DNA de Papiloma Vírus Humano (HPV) inicialmente foi realizado a extração de DNA com fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo de Sambrook *et al.* (1989) [27]. Posteriormente foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas, do tipo *nested*. Na primeira PCR foi utilizado um conjunto de primers genérico denominados PGMY09/11, descrito por Gravitt *et al.* (2000) [28]

que produz um fragmento de 450pb da região L1 do HPV. Na segunda PCR foi utilizado o primer GP5+/6+ (JACOBS *et al.*, 1997) [29], gerando amplicon de 170pb, o qual também é correspondente à região L1 do capsídeo viral. E foi utilizado como controle um pool de células hela positivas para HPV 16. Os amplicons foram separados em gel de agarose a 1,5%, e submetidos a uma tensão constante de 90V por 40 min.

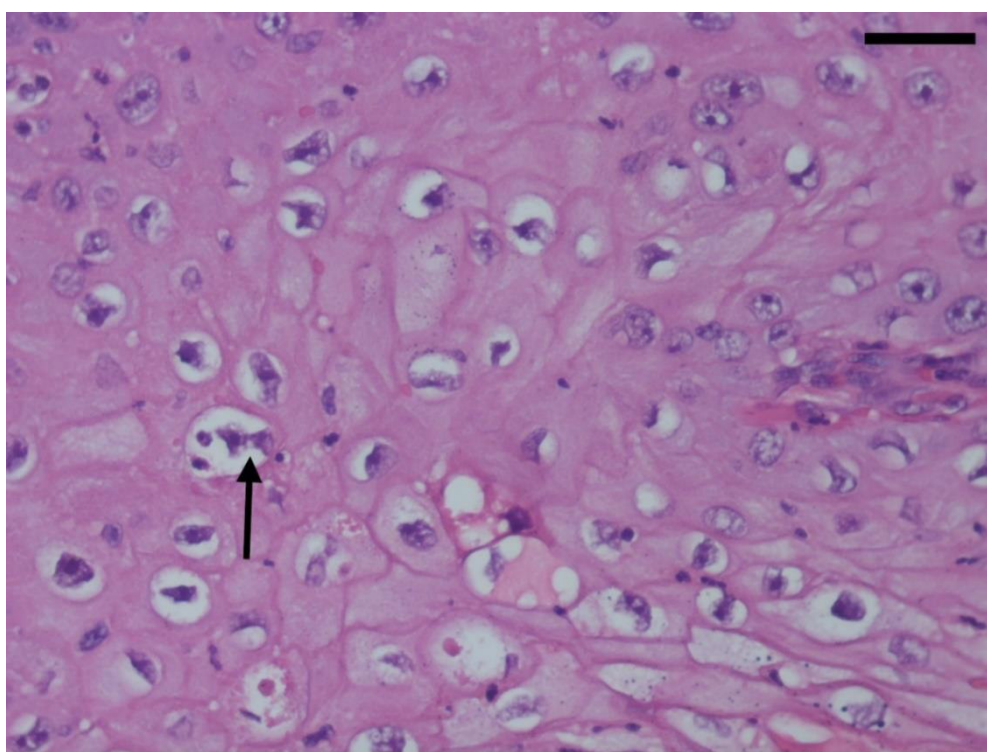


Figura 1: Histopatológico do tecido de pênis do paciente, corado por Hematoxilina-Eosina. A presença de coilocitose está indicada pela seta. Aumento de 1000x.

Para amostras positivas para presença do vírus HPV foi realizada a genotipagem do HPV a partir da reação de sequenciamento com o Kit ET Dye Terminator Cycle Sequencing, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Imunohistoquímica para a expressão da p16^{INK4a}

A imunohistoquímica para expressão da p16^{INK4a} foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante utilizando um anticorpo primário monoclonal de rato p16^{INK4a} Clone G175-405 (Zeta, Arcadia, CA, USA) diluído numa proporção de 1:75µc. A avaliação da lâmina e aquisição das imagens foram feitas usando microscópio óptico Zeiss (AxioCam MRC) e software de aquisição de imagem (Zen 2012). Para definição dos padrões de expressão da p16^{INK4a} foi utilizada uma adaptação da classificação do Cubilla *et al.* (2011) [6], onde foi excluída a porção mais superficial do epitélio e utilizada a topografia de coloração (nuclear e citoplasmática), assim foram encontrados 4 padrões de expressão de p16^{INK4a} e foram categorizados como segue: Padrão 0, ausência completa de coloração em todas as células neoplásicas; Padrão 1, coloração individual manchada, irregular e descontínua em algumas das células neoplásicas; Padrão 2, um padrão de coloração mais extenso, embora descontínuo, com pequenos aglomerados de células neoplásicas positivas; E padrão 3, coloração citoplasmática e nuclear contínua e completa em todas as células neoplásicas. Sendo que apenas o padrão 3 foi considerado positivo para expressão de p16^{INK4a} (Figura 2).

Análise estatística

Os dados foram tabulados no Excel (Microsoft Office 2013) e analisados no SPSS V22. Foi realizado análise de frequência relativa e absoluta para verificar a distribuição das variáveis categóricas. Para análise da normalidade das variáveis quantitativas foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov, estas variáveis foram descritas na forma de média e desvio padrão. A associação entre o HR- HPV e os parâmetros histológicos com expressão da proteína p16^{INK4a} se deu pela aplicação do teste Qui-quadrado de Pearson. Foi considerado como nível de significância o $p \leq 0,05$

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica – COMIC - HUUFMA com o parecer nº 2457/2014-60 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/CEP-HUUFMA com parecer de aprovação de número: 1.093.435.

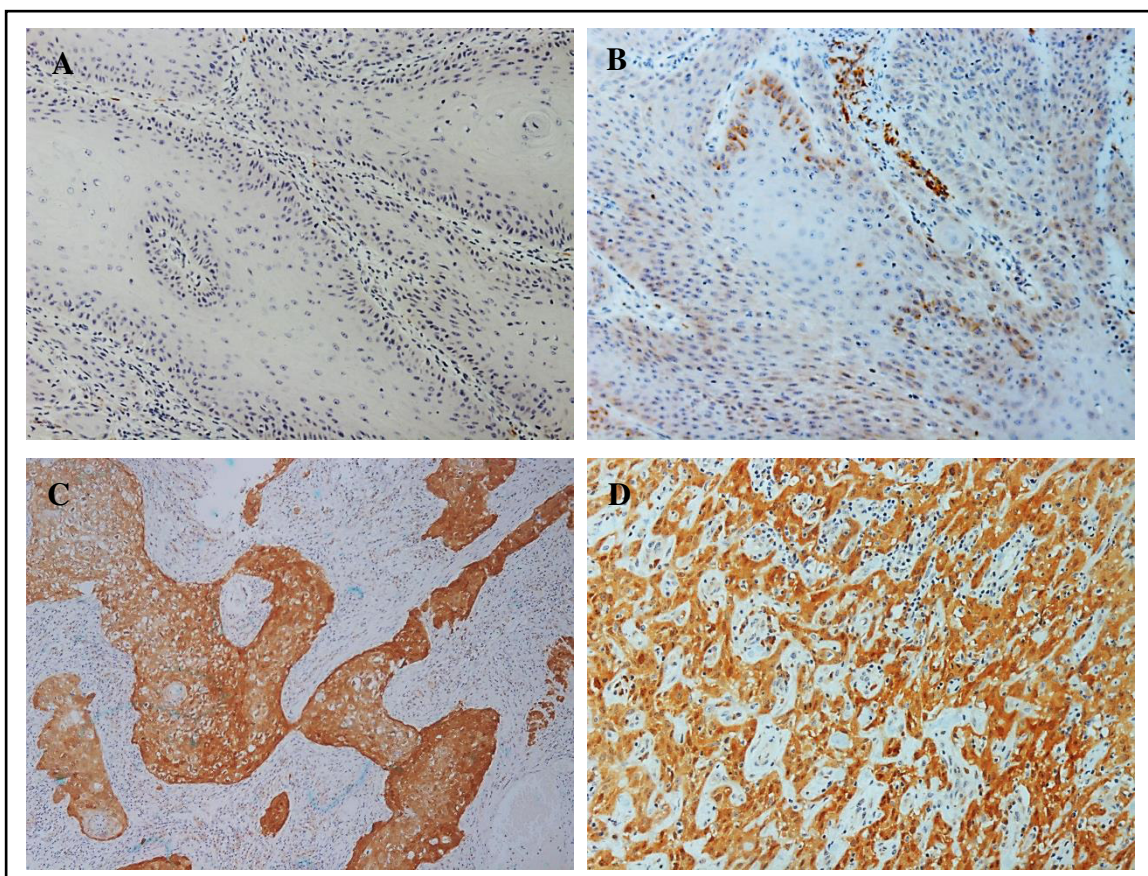


Figura 2: Padrões de expressão de p16 em carcinomas penianos. A, Padrão 0: Negatividade em todas as células neoplásicas. B, Padrão 1: células coradas isoladas. C, Padrão 2: mancha presente em algumas ou mesmo na maioria. D, Padrão 3: positividade em todas as células neoplásicas. Apenas o padrão 3 foi considerado para positividade de p16.

Resultados

Características clínico-patológicas

Foram analisados 55 casos de pacientes diagnosticados com câncer de pênis, tendo na data da intervenção cirúrgica média de idade de $61 \pm 17,87$ anos. Dentre os pacientes, 44 (80%) eram casados ou em união estável, 26 (47,3%) lavradores, 50 (90,9%) com baixo grau de escolaridade e 29 (52,7%) tabagistas. E a fimose esteve presente em 40 (72,7%) casos.

Dentre os casos, 28 (50,9%) são dos subtipos de câncer que estão associados com a presença do HPV, o carcinoma condilomatoso, basalóide ou misto com componentes condilomatoso ou basalóide. O estadiamento patológico com maior potencial metastático (estágio de pT1b a pT3) foi observado em 44 (80%) casos e 42 (76,4%) foram classificados como tumores de baixo grau histológico (GI-II). O estadiamento clínico mostrou que 46 (83,6%) casos tinham estágio maior ou igual a 2. As invasões, perineural e linfática, estiveram presentes em 19 (34,5%) e 16 (29,1%) casos, respectivamente. Na avaliação histológica a presença de coilocitose foi observada em 41 (74,5%) casos (Descrição mais detalhada das características histológicas estão descritos na tabela 1).

Genotipagem do HPV

O DNA do vírus HPV esteve presente em 49 (89,1%) casos, dos quais 46 (83,6%) foram classificados como HR-HPV e 3 (5,5%) como HPV de baixo risco oncogênico (LR-HPV) (Tabela 2). A subtipagem genômica após a extração do DNA confirmou a presença do HR-HPV, o HPV-16, em 33 (60%) casos, sendo a maioria infecções monovíricas. Dentre os casos LR-HPV foram encontrados o HPV-11, HPV-6 e HPV-30.

Proteína p16^{INK4a} e HPV

A distribuição dos padrões de expressão da proteína p16^{INK4a} está listada na tabela 3. Os resultados mostraram que 33 (60%) casos foram negativos para positividade da proteína p16^{INK4a} e 22 (40%) positivos. Dentre os casos p16^{INK4a} positivos, 11 (50%) eram de carcinoma usual e os outros 11 (50%) eram basalóide, condilomatoso ou misto com componente condilomatoso ou basalóide. E o DNA HR-HPV esteve presente em 21 (95,5%) casos p16^{INK4a} positivo. Dentre os casos LH-HPV, apenas um foi considerado p16^{INK4a} positivo.

Tabela 1: Distribuição das características histológicas e ao status da infecção do HPV.

N 55		N	%
Tipo histológico	Carcinoma epidermóide	55	100%
Subtipo do tumor	Usual	26	47,3%
	Condilomatoso	16	29,1%
	Basalóide	4	7,3%
	Misto*	9	16,3%
Tamanho do tumor	≤0,5 cm	1	1,9 %
	0,6 – 2cm	7	12,7 %
	2,1 – 5,0cm	34	61,8 %
	≥ 5,1 cm	13	23,6 %
Estágio clínico	Estágio 1	9	16,4 %
	Estágio 2	30	54,5 %
	Estágio 3	2	3,6 %
	Estágio 3 ^a	5	9,1 %
	Estágio 3b	4	7,3 %
	Estágio 4	5	9,1 %
Grau do tumor	Grau I	8	14,6 %
	Grau II	34	61,8 %
	Grau III	12	21,8 %
	Grau X	1	1,8 %
Invasão perineural	Presente	19	34,5 %
	Ausente	36	65,5 %
Invasão linfática	Presente	16	29,1 %
	Ausente	39	70,9%
Fimose	Presente	40	72,3%
	Ausente	15	27,3%
Coilocitose	Presente	41	74,5 %
	Ausente	14	25,5 %
Linfadenectomia	Presente	17	30,9 %
	Ausente	38	69,1 %

N: frequência absoluta; %: frequência relativa; *Misto: 2 usual e basalóide, 6 usual e condilomatoso, 1 usual e verrucoso

Tabela 2: Infecção pelo vírus HPV.

N 55			
DNA HPV	HPV Positivo	N	%
	HPV Negativo	49	89,1 %
Genótipo HPV	HR-HPV	6	10,9 %
	LR-HPV	46	83,6 %
		3	5,5 %

N: frequência absoluta; %: frequência relativa; DNA: ácido desoxirribonucleico; HPV: papiloma vírus humano; HPV: papiloma vírus humano; HR-HPV: HPV de alto risco oncogênico; LR-HPV: HPV de baixo risco oncogênico.

Associação da expressão da p16^{INK4a} com as características histológicas e a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico

Excluindo os casos LR-HPV das análises e considerando as características histopatológicas do carcinoma de pênis, houve associação da positividade da proteína p16^{INK4a} com o subtipo do tumor ($p = 0,036$), sendo que 100% dos carcinomas basalóides ou misto com características basalóides foram p16^{INK4a} positivos. Quando os carcinomas basalóides ou misto com características basalóides foram excluídos das análises a associação com a superexpressão da proteína p16^{INK4a} foi perdida. Em relação às outras características histológicas dos tumores, estas não foram significativamente associadas a p16^{INK4a} (Para mais detalhes vide tabela 4).

Tabela 3: Distribuição dos padrões de coloração da proteína p16^{INK4a}.

N 55			
P16	Padrão de expressão	N	%
	0	5	9,1 %
	1	6	10,9 %
	2	22	40 %
	3	22	40 %

P16: Proteína p16^{INK4a}; N: Frequência absoluta; %: Frequência relativa. Padrão de expressão da p16^{INK4a}: 0 – ausência de imunocoloração; 1 - imunocoloração manchada, irregular e descontínua; 2 - imunocoloração mais extensa, descontínua, pequenos aglomerados; 3 – coloração citoplasmática e nuclear contínua e completa.

Quanto a associação do status da infecção pelo vírus HPV e a positividade da p16^{INK4a} podemos observar na tabela 4 que houve associação significativa entre a p16^{INK4a} e a presença do DNA HPV ($p = 0,034$), e com relação ao DNA HR-HPV, também houve associação significativa com a p16^{INK4a} ($p = 0,034$), sendo 21/46 casos de HR-HPV apresentando positividade para p16^{INK4a}.

Tabela 4: Associação da proteína p16^{INK4a} às características histológicas e ao status da infecção pelo HR-HPV.

N 55			
	P16 +	P16 -	Valor de p*
Subtipo do tumor			
Basalóide	4	0	0,036
Condilomatoso	3	12	
Misto	4	5	
Usual	10	14	
Tamanho do tumor			
≤ 2cm	2	6	0,335
> 2cm	19	25	
Estágio clínico			
Estagio 1	3	6	0,635
Estágio 2 a 4	18	25	
Fimose			
Presente	15	22	0,971
Ausente	6	9	
Grau histológico			
Grau X - I	3	5	0,857
Grau II - III	18	26	
Invasão linfática			
Presente	3	11	0,091
Ausente	18	20	
Invasão perineural			
Presente	4	12	0,132
Ausente	17	19	

Linfadenectomia			
Sim	5	12	0,284
Não	17	21	
DNA HPV			
HPV +	22	27	0,034
HPV -	0	6	
Genótipo HPV			
HR-HPV	21	25	0,032
Sem HPV	0	6	

HPV: Papiloma Vírus Humano; HR-HPV: HPV de alto risco oncogênico; P16 +: superexpressão da proteína p16^{INK4a}, p16-: ausência de superexpressão da proteína p16^{INK4a}; DNA: ácido desoxirribonucleico; HPV +: presença do DNA HPV; HPV -: ausência do DNA HPV; *: Grau de significância das associações realizados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson.

Discussão

A proteína p16^{INK4a} está sendo usada como marcador alternativo do HR-HPV no carcinoma cervical e em outros carcinomas. Alguns estudos mostram que a superexpressão da proteína p16^{INK4a} no CP está relacionada com a infecção pelo HPV [6, 7]. Por outro lado, temos estudos que não encontraram tal relação [30, 31]. Assim o objetivo deste estudo foi analisar, pela primeira vez de forma prospectiva, se há associação entre a expressão da proteína p16^{INK4a} com os parâmetros histológicos e com a presença do HPV em pacientes com câncer de pênis. Para isso, diferentemente dos trabalhos anteriores, a técnica de PCR foi realizada em material a fresco ao invés de parafinado e a imunohistoquímica não utilizou cortes de microarranjo tecidual (*tissue microarray* - TMA), o que possibilitou maior amostragem tumoral.

Neste estudo, o DNA HPV foi detectado por PCR em 89,1% dos casos, o que do nosso conhecimento é o índice mais alto de HPV já detectado em câncer de pênis, pois os dados da literatura mostram que apenas de 30% a 50% dos cânceres de pênis apresentam evidência de infecção por HPV [6, 8-10, 32]. Esse elevado índice pode ser explicado devido a termos utilizado tumor a fresco e não parafinado, pois segundo Iftner e Villa, amostras incluídas em parafina são mais difíceis de serem analisadas devido ao estado de degradação do DNA que é maior quando comparado ao DNA de amostras frescas, nas quais o DNA se encontra mais íntegro [33].

Provavelmente o índice de casos associados ao HPV deve ser maior do que o já descrito na literatura, reforçando o papel da infecção viral na patogênese da lesão. O HR-HPV esteve presente em 93,9% desses casos, o que é concordante com os resultados de outras pesquisas sobre o carcinoma peniano [6-8]. E de acordo com os resultados de um estudo realizado com 127 pacientes com câncer de pênis a presença da infecção pelo HPV está relacionada a uma melhor sobrevida [34]. No nosso estudo, o HPV não esteve associado a nenhum parâmetro prognóstico histológico, exceto com o subtipo histológico do tumor, mais precisamente com o basalóide onde os 6 (100%) casos foram HPV de alto risco oncogênico. Já o estudo de Steinestel *et al.*, não encontrou associação significativa com o subtipo basalóide [9, 35]. Segundo estudo de Ferrándiz-Pulido *et al.*, os carcinomas de pênis usuais relacionados ao HR-HPV positivos parecem ter melhor prognóstico em comparação aos relacionados com HR-HPV negativo [7]. Da nossa amostra de carcinomas usuais, 19 (70,4%) casos apresentaram o HR-HPV e nenhuma evidencia relação com fatores histológicos.

Assim como em outras neoplasias, vários parâmetros histológicos têm sido associados ao prognóstico no CP, tais como: presença do HPV, grau histológico, espessura tumoral, embolização linfática ou venosa, subtipo do tumor, estágio clínico e envolvimento linfonodal [36-39]. Em nosso estudo, a expressão da proteína p16^{INK4a} esteve associado ao subtipo do tumor, principalmente aos basalóides, que apresentaram 100% de expressão da p16^{INK4a}, porém não foi observada associação com as demais características histológicas do tumor como tamanho, estágio clínico, grau histológico, invasão linfática e perineural. Um estudo com 202 casos de carcinomas invasivos de células escamosas no pênis mostrou que a expressão da p16^{INK4a} foi preferencial em tumores com características morfológicas basalóides e que esta pode ser usada como uma ferramenta no diagnóstico diferencial dos subtipos de carcinomas de pênis [6].

De acordo com Cubilla *et al.*, a positividade da p16^{INK4a} em CP está fortemente relacionada com a presença do genótipo do HPV de alto risco oncogênico, e a negatividade indicaria infecção por genótipo de baixo risco oncogênico ou ausência de DNA HPV [6]. Estudo recente em carcinomas de pênis mostrou que a presença de p16^{INK4a} e HR-HPV indica um comportamento menos agressivo do tumor [9]. No presente estudo houve associação significativa entre a expressão da p16^{INK4a} com a presença do HR-HPV, resultado semelhante a este foi encontrado nos estudos de Cubilla *et al.* [6, 8]. Dentre os casos LH-HPV, um deles foi p16^{INK4a} positivo. Esse fato pode

ser explicado pela possibilidade de uma oncogênese não relacionada com HPV envolvendo a via pRb ou devido alguns genótipos de LR-HPV serem capazes de induzir uma completa transformação maligna nas células epiteliais que infectam, atuando como os de HR-HPV [6]. Outro fato chamou atenção nos resultados: dentre os casos HR-HPV, a maioria (25/46) foi p16^{INK4a} negativo, o que pode estar relacionado com a inativação do gene codificador da p16^{INK4a} (gene CDKN2A), pela perda da heterozigosidade ou pela hipermetilação do promotor. Além disso, estudos com carcinomas cervicais associados ao HPV mostram máxima expressão do p16^{INK4a} em carcinoma in situ, e uma redução na expressão à medida que se tornam invasivos [6, 40].

Assim como em outros estudos, tivemos limitações para a realização desta pesquisa. Uma das limitações deste estudo foi identificar qual o padrão de coloração da p16^{INK4a} deve ser considerado como ponto de corte para p16^{INK4a} ser positiva. Outra limitação foi não ter conseguido avaliar a sobrevida dos pacientes, pois a maioria mora em cidades localizadas nas zonas rurais distantes da capital e, após a cirurgia, frequentemente não retornam para acompanhamento médico.

Conclusões

Nesse estudo prospectivo a expressão da proteína p16^{INK4a} esteve associada à presença do vírus HPV de alto risco oncogênico no carcinoma de pênis. Portanto, essa proteína pode servir como marcador alternativo da presença do vírus. Mostrou também, que a proteína p16^{INK4a} está associada ao subtipo basalóide de tumor, mas não aos outros parâmetros prognósticos histológicos. Além disso, foi encontrada a mais alta incidência do vírus HPV já registrada em câncer de pênis, com absoluta predominância do HPV de alto risco oncogênico, o que pode ser explicado pelo fato do nosso trabalho ser o primeiro a utilizar amostras teciduais frescas ao invés de emblocadas em parafina.

Listo of Abbreviations

CP: Câncer de pênis

HPV: Papiloma Vírus Humano

HR-HPV: Papiloma Vírus Humano de alto risco oncogênico

pRb: Proteína do retinoblastoma

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

LR-HPV: Papiloma Vírus Humano de baixo risco oncogênico

TMA: *tissue microarray*

Agradecimentos

Os autores agradecem a Rayanne Araujo Pessoa pela excelente assistência técnica e as contribuições de Thiago Teixeira Mendes e Marcela Rodrigues de Castro.

Financiamento

O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (*FAPEMA*). Aqueles que forneceram financiamento não têm papel no design do estudo, na coleta de dados, na análise, na interpretação dos dados, na redação do artigo ou na decisão de enviar o artigo para publicação.

Disponibilidade de dados e materiais

Não se aplica.

Contribuições dos autores

FFS; JDP; LNZR; JRC; SRFP; LRN e GEBS fizeram contribuições substanciais para concepção, design do estudo e o financiamento obtido. Todos os autores fizeram a aquisição, análise e interpretação dos dados dos pacientes sobre câncer de pênis. VAM; AALTJ; HAC e GEBS estiveram envolvidos na redação e na revisão crítica do manuscrito. Todos os autores leram, comentaram e aprovaram o manuscrito final.

Consentimento para publicação

Não se aplica.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

Aprovação ética e consentimento para participar

Este estudo prospectivo foi aprovado pela Comissão Científica – COMIC - HUUFMA com o parecer nº 2457/2014-60 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/CEP-HUUFMA com parecer de aprovação de número: 1.093.435. O Termo de Consentimento e Livre e Esclarecido foi assinado por todos os pacientes que fizeram parte da amostra deste estudo.

Referências

1. Velazquez EF, Cubilla AL: **Penile squamous cell carcinoma: anatomic, pathologic and viral studies in Paraguay (1993-2007)**. *Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology* 2007, **29**(4):185-198.
2. Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA: **Penile cancer**. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2006, **54**(3):369-391.
3. Barocas DA, Chang SS: **Penile cancer: clinical presentation, diagnosis, and staging**. *Urologic Clinics of North America* 2010, **37**(3):343-352.
4. Fonseca AGd, Pinto JASdA, Marques MC, Drosdoski FS, Fonseca Neto LORd: **Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil**. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 2010, **1**(2):85-90.
5. Christodoulidou M, Sahdev V, Houssein S, Muneer A: **Epidemiology of penile cancer**. *Current Problems in Cancer*, **39**(3):126-136.
6. Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, Clavero O, Chaux A, Kasamatsu E, Monfuleda N, Tous S, Alemany L, Klaustermeier J: **Value of p16INK4a in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: a report of 202 cases**. *The American journal of surgical pathology* 2011, **35**(2):253-261.
7. Ferrándiz-Pulido C, Masferrer E, de Torres I, Lloveras B, Hernandez-Losa J, Mojal S, Salvador C, Morote J, y Cajal SR, Pujol RM: **Identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penile squamous cell carcinomas: Correlation**

- with pathologic subtypes, p16 INK4a expression, and prognosis.** *Journal of the American Academy of Dermatology* 2013, **68**(1):73-82.
8. Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, Clavero O, Chaux A, Kasamatsu E, Velazquez EF, Lezcano C, Monfuleda N, Tous S: **The basaloid cell is the best tissue marker for human papillomavirus in invasive penile squamous cell carcinoma: a study of 202 cases from Paraguay.** *The American journal of surgical pathology* 2010, **34**(1):104-114.
 9. Steinestel J, Al Ghazal A, Arndt A, Schnoeller TJ, Schrader AJ, Moeller P, Steinestel K: **The role of histologic subtype, p16 INK4a expression, and presence of human papillomavirus DNA in penile squamous cell carcinoma.** *BMC cancer* 2015, **15**(1):220.
 10. Camilo HP: **Análise da expressão das proteínas celulares p53, p16 e ciclina D1 em amostras de tumores penianos.** 2014.
 11. Gil AO, Pompeo AC, Goldstein PJ, Saldanha LB, Mesquita JL, Arap S: **Analysis of the association between Human Papillomavirus with penile carcinoma.** *Braz J Urol* 2001, **27**(5):461-468.
 12. Ornellas A, Brown G, Ferreira C, Rocha J: **Câncer urológico (câncer de pênis).** *Ferreira CG, Rocha JC Oncologia molecular São Paulo: Atheneu* 2004:224-229.
 13. Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L, Salatiello I, Beth-Giraldo E, Giraldo G: **Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas.** *Journal of General Virology* 2000, **81**(12):2969-2982.
 14. Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman J: **Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis.** *The Journal of urology* 1992, **147**(2):389-392.
 15. Singh S, Johnson J, Chellappan S: **Small molecule regulators of Rb–E2F pathway as modulators of transcription.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 2010, **1799**(10):788-794.
 16. Vousden K: **Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes.** *The FASEB Journal* 1993, **7**(10):872-879.
 17. Ferraz LdC, Santos ABR, Discacciati MG: **Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos.** *J Health Sci Inst* 2012.
 18. Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, Gallee MP, Raaphorst FM, von Knebel Doeberitz M, Meijer CJ, Snijders PJ: **Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus.** *The Journal of pathology* 2003, **201**(1):109-118.
 19. Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, Paba P, Favalli C, Costa S, Agarossi A: **p16INK4A Expression Is Related to Grade of CIN and High-risk**

- Human Papillomavirus but Does not Predict Virus Clearance After Conization or Disease Outcome.** *International journal of gynecological pathology* 2004, **23**(4):354-365.
20. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, Jiang B, Wakely P, Xiao W, Gillison ML: **Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials.** *The American journal of surgical pathology* 2012, **36**(7):945-954.
 21. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M: **p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia.** *The American journal of surgical pathology* 2002, **26**(11):1389-1399.
 22. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti MC, Wright T, Rodriguez AC: **Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica.** *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2004, **13**(8):1355-1360.
 23. Bethune G, Campbell J, Rocker A, Bell D, Rendon R, Merrimen J: **Clinical and pathologic factors of prognostic significance in penile squamous cell carcinoma in a North American population.** *Urology* 2012, **79**(5):1092-1097.
 24. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, Girlando S, Rosso S, Naldoni C, Dalla Palma P: **Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial.** *The Lancet Oncology* 2013, **14**(2):168-176.
 25. Gunia S, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M: **p16 INK4a is a Marker of Good Prognosis for Primary Invasive Penile Squamous Cell Carcinoma: A Multi-Institutional Study.** *The Journal of urology* 2012, **187**(3):899-907.
 26. Edge SB, Compton CC: **The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.** *Annals of surgical oncology* 2010, **17**(6):1471-1474.
 27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular cloning: a laboratory manual:** Cold spring harbor laboratory press; 1989.
 28. Gravitt P, Peyton C, Alessi T, Wheeler C, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman M, Scott D, Apple R: **Improved amplification of genital human papillomaviruses.** *Journal of clinical microbiology* 2000, **38**(1):357-361.
 29. Jacobs MV, Snijders P, Van Den Brule A, Helmerhorst T, Meijer C, Walboomers J: **A general primer GP5+/GP6 (+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings.** *Journal of clinical microbiology* 1997, **35**(3):791-795.

30. Senba M, Buziba N, Mori N, Wada A, Irie S, Toriyama K: **Detection of human papillomavirus and cellular regulators p16INK4a, p53, and NF-κB in penile cancer cases in Kenya.** *Acta virologica* 2009, **53**(4):43.
31. Poetsch M, Hemmerich M, Kakies C, Kleist B, Wolf E, Vom Dorp F, Hakenberg OW, Protzel C: **Alterations in the tumor suppressor gene p16INK4A are associated with aggressive behavior of penile carcinomas.** *Virchows Archiv* 2011, **458**(2):221-229.
32. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, Pirog EC: **Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis.** *The American journal of pathology* 2001, **159**(4):1211-1218.
33. Iftner T, Villa LL: **Human papillomavirus technologies.** *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2002(31):80-88.
34. Tang DH, Clark PE, Giannico G, Hameed O, Chang SS, Gellert LL: **Lack of P16 ink4a Over Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma is Associated with Recurrence after Lymph Node Dissection.** *The Journal of urology* 2015, **193**(2):519-525.
35. Chaux A, Pfannl R, Lloveras B, Alejo M, Clavero O, Lezcano C, Muñoz N, de Sanjosé S, Bosch X, Hernández-Pérez M: **Distinctive association of p16INK4a overexpression with penile intraepithelial neoplasia depicting warty and/or basaloid features: a study of 141 cases evaluating a new nomenclature.** *The American journal of surgical pathology* 2010, **34**(3):385-392.
36. Burgers J, Badalament R, Drago J: **Penile cancer. Clinical presentation, diagnosis, and staging.** *The Urologic clinics of North America* 1992, **19**(2):247-256.
37. Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S, Young RH: **Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection.** *International journal of surgical pathology* 2001, **9**(2):111-120.
38. Emerson RE, Ulbright TM, Eble JN, Geary WA, Eckert GJ, Cheng L: **Predicting cancer progression in patients with penile squamous cell carcinoma: the importance of depth of invasion and vascular invasion.** *Modern Pathology* 2001, **14**(10):963-968.
39. Lopes A, Bezerra ALR, Pinto CAL, Serrano SV, de Mello CA, Villa LL: **p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy.** *The Journal of urology* 2002, **168**(1):81-86.
40. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T: **Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions.** *The American journal of pathology* 1998, **153**(6):1741-1748.