



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



**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTADO FÍSICO
GENÔMICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
TUMORES DE PÊNIS**

ANTONIO AUGUSTO LIMA TEIXEIRA JÚNIOR

São Luís

2019

ANTONIO AUGUSTO LIMA TEIXEIRA JÚNIOR

**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTADO FÍSICO
GENÔMICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
TUMORES DE PÊNIS**

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

Área de concentração: HPV e câncer

Orientador:

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

Coorientadora:

Profa. Dra. Jaqueline Diniz Pinho

Coordenadora:

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão
Nascimento

São Luís

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Lima Teixeira Júnior, Antonio Augusto.

PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTADO FÍSICO GENÔMICO DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO HPV EM TUMORES DE PÊNIS / Antonio
Augusto Lima Teixeira Júnior. - 2019.

141 p.

Coorientador(a): Jaqueline Diniz Pinho.

Orientador(a): Gyl Eanes Barros Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2019.

1. Câncer de pênis. 2. Estado físico HPV. 3.
Expressão proteica. 4. HPV. I. Barros Silva, Gyl Eanes.
II. Diniz Pinho, Jaqueline. III. Título.

ANTONIO AUGUSTO LIMA TEIXEIRA JÚNIOR

**PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO E ESTADO FÍSICO
GENÔMICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
TUMORES DE PÊNIS**

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

A Banca examinadora da defesa de Mestrado apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: 20 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. José de Ribamar Rodrigues Calixto

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Rui Miguel da Costa Oliveira

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade

Universidade Federal do Maranhão

A Deus, pelo milagre da vida.

Aos pacientes, razão principal desta pesquisa.

Aos meus pais, Aldenir (*in memoriam*) e Antonio.

A minha irmã Ana Patrícia e ao meu cunhado Kerly.

Aos meus amigos e familiares pelo amor e cuidado.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo milagre da vida e pelo amor e cuidado imensuráveis ao longo de minha caminhada.

Aos pacientes, os quais aqui descrevo suas histórias em um momento tão delicado que é a luta contra o câncer.

Aos meus pais, Aldenir (*in memoriam*) e Antonio, por serem meu espelho de caráter, inconformismo e persistência, características que hoje são de suma importância para minha vida como pesquisador.

A minha irmã, Ana Patrícia Rodrigues Teixeira dos Reis, pelo duplo lugar em minha vida (mãe e irmã). É impossível relatar com palavras o quão importante foi o seu papel para que hoje eu estivesse aqui, buscando meus sonhos e crescendo. Agradeço a Deus pelo seu amor e cuidado.

Ao meu cunhado, Kerly dos Reis, por ser um segundo pai para mim. Agradeço pelo cuidado, amor e carinho dedicados em todos os momentos

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva, pela amizade e por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial como profissional e pesquisador. É impossível descrever em palavras minha gratidão por tudo durante esses dois anos. Com certeza este trabalho é apenas o primeiro de muitos que ainda realizaremos. Muito obrigado!

A Marta Regina de Castro Belfort, minha parceira nas mais diversas situações. Deus une propósitos e propósitos unem pessoas! Obrigado por todo o apoio dado a realização deste trabalho, e sobretudo pela amizade construída durante esses anos de pesquisa juntos. Venceremos!

A Profa. Dra. Jaqueline Diniz Pinho, minha querida amiga e coorientadora, pela amizade e por toda a trajetória da realização deste trabalho. Estamos juntos nessa jornada de pesquisadores há algum tempo e com certeza esse caminho se torna mais leve com a sua companhia. Meu muito obrigado por tudo!

A Syomara Pereira da Costa Melo, pelas contribuições nas análises histopatológicas dos tumores descritos neste trabalho. Agradeço pelo cuidado e atenção na descrição de todos

os critérios estudos nos casos. Meu muito obrigado pela sua amizade e apoio ao longo da execução deste trabalho.

A Liseana Barbosa (Lili), pelas análises histopatológicas minuciosas dos casos descrito aqui. Agradeço imensamente a paciência e cuidado investido em todas as análises. Sua organização no trabalho com certeza me ajudou bastante a conduzir este trabalho de forma fluída e sem muitas intercorrências.

Aos médicos que compõem o corpo clínico do nosso grupo de pesquisa em câncer de pênis, Dr. Leudivan Nogueira, Dr. José Calixto, Dr. Ronald Coelho e Dr. Francisco Sérgio.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica, Neto (fake) e Thaís. Com toda certeza parte deste trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês. Sou eternamente grato pela oportunidade de ensina-los e também por aprender simultaneamente em tantos aspectos. Torço todos os dias pela trajetória de vocês! Espero poder contribuir na formação de vocês e lá na frente me orgulhar do futuro brilhante e cheio de conquistas que com certeza irão ter. Hoje estou defendendo minha dissertação, amanhã serão vocês. Muito obrigado por tudo!

Aos meus queridos amigos Hadda Leite e Claro Rangel, pela amizade construída ao longo do curso de mestrado e que com certeza quero levar pra vida toda! Meus dias no PPGSAD foram mais felizes com a companhia de vocês. Ainda temos muita história para viver e compartilharmos juntos. Muito obrigado por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica, Victor, Rayanne, Nadja, Fernanda, Athienne, Nilma e Ciro. Obrigado pelas contribuições diretas e indiretas na realização desta pesquisa.

A minha querida amiga, Thalita Moura, por todos os momentos que juntos passamos desde o início de nosso curso de graduação (2013). Agradeço imensamente à Deus por nossa amizade ter rompido os muros da universidade e se enraizado em todas as áreas de nossas vidas. Sua amizade é de extrema valia para mim. Em 2020 é você defendendo hahaha.

Ao meu amigo querido amigo Joe, pelo carinho e pela amizade mais bipolar que eu tenho (hahahaha). Obrigado por ser um ótimo amigo nos momentos mais difíceis que passei nos

últimos anos, e por compartilhar também momentos incríveis e felizes comigo. Agradeço imensamente a Deus pela tua amizade.

A Mairla Colins (Bio; vida) e Emilly Moraes, pela amizade e por terem feito parte dessa história de lutas. Com toda certeza carregar o peso de muitos fardos, da graduação ao mestrado, foi mais fácil com ajuda de vocês. Que nossas histórias sejam sempre repletas de alegrias e realizações, independente dos caminhos que venhamos a percorrer. Obrigado por tudo!

A Candido Henrique, pelo cuidado, amor, paciência e compreensão comigo durante todo o período de execução deste trabalho. Agradeço por todos os dias em que me deste ânimo e me fizeste sorrir quando o cansaço e o medo batiam na porta. São muitas histórias ainda para serem escritas em minha carreira como cientista, e com certeza conto com seu apoio em todas elas. Obrigado por tudo!

A Geisa Borges (Jennifer Lopez), por me proporcionar manhãs mais alegres e descontraídas no setor de patologia onde diariamente convivo. Agradeço imensamente por fertilizar meus sonhos e por me apoiar e me estimular a vislumbrar um futuro cheio de conquista e realizações. Meu muito obrigado pela amizade e pelo carinho.

A Gabriela Dominici (Gabi), por todos os bons momentos e pelas loucuras que já passamos juntos. Sua amizade com certeza foi um plano muito louco do universo pra minha vida. Obrigado por estar comigo nas mais diversas situações e por hoje poder compartilhar comigo mais esse momento único. Gratidão hahahaha.

Ao meu grupinho do rolê de luxo, Bárbara Curvina, Carol Webá, Thayná Almeida, Vitaliano Júnior, Nathan Bial e Sarah França. Obrigado pela amizade e pelos momentos mais engraçados e loucos da minha vida. Com vocês tive as férias mais legais durante esses dois anos de realização desta pesquisa. Amo vocês!

A todos meus amigos do “pseudogene” por aturarem meus momentos de surto durante esses dois anos. Guerreiros demais!

A Gilsilene Araújo (Gil), por todas as gargalhadas e histórias mirabolantes que só você sabe contar. Agradeço pela amizade, estímulo e pelas horas gastas chorando e nos ajudando em busca de um amanhã melhor.

Aos meus amigos Carlos Monteiro (Vanish) e Vinícius Carvalho, por compartilharem momentos únicos comigo e sempre se disponibilizarem a me ajudar nas mais diversas situações. Amo vocês!

Aos demais amigos pelo carinho e participação em minha vida, seja no âmbito profissional ou pessoal. Em especial a Juliana Diniz, Nanny Victoria, Bruno Leite, Cleyton Campos, Thayza Raquel, Bianca Lucchese, Mariana Froes, Emanuel Frões, Paula Macena, Bárbara Macena, Lucas de Santana, Diego Vinícius, Carol Campelo, Lucas Martins, Thaís Chaves e Adriana Oliveira.

Aos amigos da turma 16 do PPGSAD, por todos os momentos de aprendizado e também pelos aperreios que passamos juntos durante esses dois anos de mestrado. Espero que nossa amizade dure e que possamos trocar experiências no âmbito profissional, acadêmico e pessoal. Somos todos vencedores por escolhermos dar mais um passo em nossas vidas cursando uma pós-graduação!

Ao Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC) da Universidade Federal do Maranhão, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Magalhães, e ao Núcleo de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Pará, na pessoa do Prof. Dr. André Salim, por todo o suporte dado a realização dos ensaios moleculares descritos neste trabalho.

Ao Hospital do Câncer Aldenora Bello e ao Hospital Universitário Presidente Dutra, pela autorização para que esta pesquisa fosse desenvolvida em suas dependências.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD-UFMA), pelos dois anos de muito aprendizado. Ao José pela paciência e cuidado no repasse de todas as informações do programa. A todos os professores que contribuíram com minha formação durante este período no PPGSAD. Muito obrigado!

A Universidade Federal do Maranhão, por me proporcionar o tripé ensino-pesquisa-extensão durante minha formação em Ciências Biológicas e durante todo o mestrado em Saúde do Adulto.

A FAPEMA, pelo suporte financeiro concedido para a realização dos ensaios aqui descritos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho e na minha jornada até aqui.

“Como frequentemente ocorre na pesquisa do câncer, os avanços importantes vieram de fontes inesperadas, das bancadas de cientistas que jamais haviam se imaginado como verdadeiros soldados na luta contra a doença.”

(Robert A. Weinberg)

RESUMO

O câncer de pênis é considerado uma neoplasia rara em países desenvolvidos. No entanto, possui alta incidência em países em desenvolvimento, como os da África, Ásia e América do Sul. O estado do Maranhão, Brasil, possui a maior incidência global já registrada da doença, sendo considerada um grave problema de saúde pública local. Apesar de estar associado a alguns fatores de risco, como infecção pelo papilomavírus humano (HPV), ainda são escassos trabalhos que visem compreender a biologia destes tumores, sobretudo com achados de valor diagnóstico, prognóstico e terapêutico. Diante disso, este estudo teve como objetivo identificar o estado físico genômico do papilomavírus humano (HPV) em tumores de pênis e avaliar o perfil de expressão das proteínas ki67, p53, p16 e E6. Foi realizado o levantamento de casos diagnosticados em dois hospitais de referência no Maranhão (HUUFMA e HCAB), dos quais 100 casos foram submetidos às análises propostas neste estudo. Todos os casos foram revisados histologicamente por dois patologistas distintos. A detecção de HPV foi conduzida por PCR qualitativa a partir de material biológico (DNA) obtido dos blocos de parafina contendo tecido tumoral de cada paciente, utilizando os primers genéricos PGMY09/11 e GP5+/GP6+. Os *amplicons* foram avaliados em gel de agarose a 1,5%. A análise de expressão proteica foi conduzida por imuno-histoquímica, utilizando anticorpos monoclonais para cada marcador e seguindo as recomendações do fabricante. O estado físico genômico foi avaliado pelo método HPV/IntG/ PCR multiplex (*in house*), sendo classificado em epissomal, integrado ou misto. Os resultados desta pesquisa revelaram alta prevalência de tumores infectados pelo papilomavírus humano (HPV), com 67,1% dos casos positivos na análise molecular (PCR). Foi possível avaliar o estado físico genômico do HPV em 11 amostras, das quais todas possuíam integração viral no genoma hospedeiro, havendo um padrão de integração mais prevalente envolvendo as regiões E1 e E7 do genoma viral (54,5%). Quando avaliados histologicamente, 88,4% dos casos apresentavam alterações sugestivas de infecção pelo vírus (coilocitose) e 58% apresentaram superexpressão da proteína p16, marcador indireto de infecção por HPV de alto risco oncogênico. A positividade para p16 esteve associada à presença de HPV por PCR ($p=0,006$), subtipos histológicos associados ao HPV ($p=0,05$) e subtipo histológico basalóide ($p=0,02$). A ausência de expressão de E6 esteve associada a tumores bem diferenciados ($p=0,001$), ausência de invasão angiolinfática ($p=0,001$) e perineural ($p=0,001$), estadiamento I-II ($p=0,01$) e tumores condilomatosos ($p=0,005$). Enquanto que a positividade para E6 esteve associada a metástase linfonodal ($p=0,001$) e extensão extranodal ($p=0,02$). Cerca 64% dos casos foram negativos na análise de expressão de p53, a qual esteve associada a características clínico-histopatológicas como: subtipo histológico ($p=0,002$), grau de diferenciação ($p=0,007$) e tumor primário ($p=0,02$). O perfil de expressão de ki67 também revelou associação com importantes parâmetros, como tamanho da lesão ($p=0,04$), grau de diferenciação ($p=0,001$), invasão perineural ($p=0,05$), estadiamento ($p=0,03$), metástase linfonodal ($p=0,002$) e extensão extranodal ($p=0,002$). Na análise de sobrevida livre da doença (SLD), a presença de coilocitose e negatividade para p53 estiveram associadas a melhor SLD, enquanto que a positividade para p16 e E6 esteve associada a menor sobrevida livre da doença. Os achados desta pesquisa corroboram com outros trabalhos que evidenciam alta prevalência de tumores de pênis infectados por HPV no Maranhão e descreve pela primeira vez o perfil de integração do genoma viral em tumores de pênis em uma área de alta incidência. Além disso, revela um perfil de expressão de proteica com importantes associações com fatores diagnósticos e prognósticos.

Palavras-chave: câncer de pênis, HPV, p53, p16, ki67, E6, estado físico HPV.

ABSTRACT

Penile cancer is considered a rare cancer in developed countries. However, it has a high incidence in developing countries, such as Africa, Asia and South America. The state of Maranhão, Brazil, has the highest global incidence ever recorded, being considered a serious local public health problem. Despite being associated with some risk factors, such as human papillomavirus (HPV) infection, there are still few studies that aim to understand the biology of these tumors, especially with diagnostic, prognostic and therapeutic findings. Therefore, this study aimed to identify the genomic physical state of human papillomavirus (HPV) in penile tumors and to evaluate the expression profile of ki67, p53, p16 and E6 proteins. The survey of cases diagnosed in two referral hospitals in Maranhão (HUUFMA and HCAB) was carried out, from which 100 cases were submitted to the analyzes proposed in this study. All cases were histologically reviewed by two distinct pathologists. HPV detection was conducted by qualitative PCR from biological material (DNA) obtained from paraffin blocks containing tumor tissue from each patient using the generic primers PGMY09 / 11 and GP5 + / GP6 +. Amplicons were evaluated on 1.5% agarose gel. Protein expression analysis was conducted by immunohistochemistry using monoclonal antibodies for each marker and following the manufacturer's recommendations. The HPV physical state was evaluated by the HPV-IntG / PCR multiplex (in house) method and was classified as episomal, integrated or mixed. The results of this research revealed a high prevalence of human papillomavirus (HPV) infected tumors, with 67.1% of the positive cases in molecular analysis (PCR). It was possible to evaluate the HPV genomic physical state in 11 samples, all of which had viral integration in the host genome, with a more prevalent integration pattern involving the E1 and E7 regions of the viral genome (54.5%). When histologically evaluated, 88.4% of the cases presented alterations suggestive of virus infection (koilocytosis) and 58% presented overexpression of p16 protein, an indirect marker of high oncogenic risk HPV infection. Positivity for p16 was associated with the presence of HPV by PCR ($p=0.006$), HPV-associated histological subtypes ($p=0.05$), and basaloid histological subtype ($p=0.02$). Absence of E6 expression was associated with well-differentiated ($p=0.001$) tumors, absence of angiolymphatic ($p=0.001$) and perineural ($p=0.001$) invasion, staging I-II ($p=0.01$) and condylomatous tumors ($p=0.005$). While positivity for E6 was associated with lymph node metastasis ($p=0.001$) and extranodal extension ($p=0.02$). About 64% of the cases were negative in p53 expression analysis, which was associated with clinical and histopathological characteristics such as: histological subtype ($p=0.002$), degree of differentiation ($p=0.007$) and primary tumor ($p=0.02$). The ki67 expression profile also showed association with important parameters such as lesion size ($p=0.04$), degree of differentiation ($p=0.001$), perineural invasion ($p=0.05$), staging ($p=0.03$), lymph node metastasis ($p=0.002$) and extranodal extension ($p=0.002$). In the analysis of disease-free survival (SLD), the presence of koilocytosis and negativity for p53 were associated with better SLD, while positivity for p16 and E6 was associated with lower disease-free survival. The findings of this research corroborate other studies that show a high prevalence of HPV-infected penile tumors in Maranhão and describe for the first time the profile of viral genome integration in penile tumors in an area with high incidence of penile cancer. In addition, it reveals a protein expression profile with important associations with diagnostic and prognostic factors.

Keywords: penile cancer, HPV, p53, p16, ki67, E6, HPV physical state.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1.	Distribuição de casos diagnosticados com câncer de pênis (n=100) por ano (2012-2019) no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA) e Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB)	42
Figura 1.	Corte histológico de tumor de pênis evidenciando a presença de coilócitos (seta preta) em aumento de 1000x	47
Figura 2.	Expressão da proteína supressora tumoral p16 por imuno-histoquímica. Em vermelho destacou-se área representativa do índice de positividade para este marcador	49
Figura 3.	Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de coilocitose (log-rank $p=0,006$)	50
Figura 4.	Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 (log-rank $p=0,03$)	51
Figura 5.	Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores pT1-pT2. (log-rank $p=0,51$)	51
Figura 6.	Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores pT3-pT4. (log-rank $p=0,32$)	52
Figura 7.	Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores com estágio I e II. (log-rank $p=0,09$)	52
Figura 8.	Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores com estágio III-IV (log-rank $p=0,32$)	53
Figura 9.	Análise de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de pênis submetidos a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico de acordo com a positividade para p16 (log-rank $p=0,40$)	53
Figura 10.	Análise de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de pênis que não foram submetido a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico de acordo com a positividade para p16 (log-rank $p=0,25$)	54
Figura 11.	Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para HPV (log-rank $p=0,31$)	54

Figura 12.	Expressão da proteína oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) por imuno-histoquímica em cortes histológicos	59
Figura 13.	Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para E6 (log-rank $p=0,17$)	63
Figura 14.	Expressão da proteína supressora tumoral p53 por imuno-histoquímica em cortes histológicos	64
Figura 15.	Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para p53 (log-rank $p=0,01$)	66
Figura 16.	Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes com tumores condilomatosos de acordo com o perfil de p53 (log-rank $p=0,001$).	66
Figura 17.	Expressão geral do marcador de proliferação celular (ki67) por imuno-histoquímica em cortes histológicos	70
Figura 18.	Expressão em <i>hotspot</i> do marcador de proliferação celular (ki67) por imuno-histoquímica em cortes histológicos	71
Figura 19.	Análise de sobrevida livre da doença de acordo com o perfil de geral de expressão de ki67 (log-rank $p=0,19$)	73
Figura 20.	Análise de sobrevida livre da doença de acordo com o perfil de expressão de ki67 em <i>hotspot</i> (log-rank $p=0,31$)	74

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Perfil clínico-histopatológico dos 100 pacientes com câncer de pênis avaliados no presente estudo	45
Tabela 1.	Subtipos histológicos em câncer de pênis	25
Tabela 2.	Sistema TNM para estadiamento de câncer de pênis de acordo com AJCC e IUAC.....	26
Tabela 3.	Especificações dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunohistoquímica	37
Tabela 4.	Primers utilizados para detecção do HPV nas amostras de câncer de pênis	39
Tabela 5.	Especificações de preparo de mix de PCR e condições de termociclagem	38
Tabela 6.	Distribuição de expressão proteica de p16 nos tumores avaliados (n=100)	49
Tabela 7.	Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com a presença de coilócitos, superexpressão de p16 e positividade molecular para HPV	55
Tabela 8.	Distribuição de expressão proteica de E6 nos tumores avaliados (n=100)	58
Tabela 9.	Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com o perfil de expressão da oncoproteína E6-HPV.....	60
Tabela 10.	Distribuição de expressão proteica de p53 nos tumores avaliados (n=100)	64

Tabela 11.	Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com a expressão de p53	67
Tabela 12.	Distribuição de expressão proteica de ki67 nos tumores avaliados (n=100)	72
Tabela 13.	Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com a expressão de ki67.....	75
Tabela 14.	Perfil de integração genômica do papilomavírus humano (HPV) 16 em tumores de pênis	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CaPe	Câncer de pênis
°C	Graus Celsius
SLD	Sobrevida livre de doença
CEC	Carcinoma de células escamosas
HPV	Papilomavírus humano
LIME	Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica
HUUFMA	Hospital Universitário Presidente Dutra
CEPEC	Centro de Pesquisa Clínica
HCAB	Hospital do Câncer Aldenora Bello
MA	Maranhão
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-embedded</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
pb	Pares de base
μL	Microlitro
μM	Micromolar
RPM	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Epidemiologia do câncer de pênis	20
1.2 Características clínicas	22
1.3 Classificação histopatológica	24
1.4 HPV & câncer de pênis: aspectos gerais	27
1.5 Oncogênese induzida por HPV	29
2. OBJETIVO	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1 Aspectos éticos	34
3.2 Caracterização do estudo	34
3.3 Período e local	34
3.4 Amostras	34
3.5 Critérios de inclusão	35
3.6 Critérios de exclusão	35
3.7 Variáveis analisadas	35
3.8 Etapas do estudo	35
3.8.1 Levantamento de casos	35
3.8.2 Revisão de lâminas	36
3.8.3 Seleção de área tumoral	36
3.8.4 Expressão proteica por imuno-histoquímica	36
3.8.5 Extração de DNA	37
3.8.6 Detecção do papilomavírus humano (HPV)	38
3.8.6.1 Análise histológica	38
3.8.6.2 Análise Molecular	38
3.8.6.3 Análise imuno-histoquímica de p16	40
3.9 Estado físico genômico HPV 16	41
3.10 Análise de dados	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Levantamento de casos diagnosticados com câncer de pênis	42

4.2 Perfil clínico-histopatológico	43
4.3 Detecção do papilomavírus humano (HPV)	47
4.4 Expressão proteica de E6	58
4.5 Expressão proteica de p53	64
4.6 Expressão proteica de ki67	70
4.7 Estado físico genômico HPV 16	78
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS	91
8. ANEXOS	103
9. ARTIGO CIENTÍFICO (1ª autoria)	104
10. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS (2018-2019)	105

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de pênis

De acordo com os levantamentos epidemiológicos na área, o câncer de pênis (CaPe) é considerado uma neoplasia de ocorrência rara em países desenvolvidos, principalmente na América do Norte e Europa Ocidental. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, menos de um a cada 100.000 homens são afetados pela doença nos Estados Unidos, com estimativa de 2.320 novos casos e 380 mortes por CaPe para o ano de 2018 no país. No entanto, há uma alta incidência deste tipo de câncer em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, África e América do Sul (POW-SANG et al., 2010; CHRISTOULIDOU et al., 2015).

Há poucos trabalhos que descrevam os aspectos etiológicos de CaPe quando comparamos com o acervo de informações disponíveis para outros tipos de tumores (ROMERO et al., 2013). Sabe-se que a doença parece afetar mais frequentemente homens em condições socioeconômicas e educacionais desfavoráveis, sendo associada a fatores como idade, fimose, má higienização do pênis, tabagismo, etilismo, condições de inflamação crônica no pênis e infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) (CARVALHO et al., 2007; SENKOMAGO et al., 2016; RODNEY, 2016).

Dentre os países da América do Sul, o Brasil representa a localidade com maior incidência da doença. Até o ano de 2017, de acordo com um levantamento realizado por Favorito e colaboradores (2008), a incidência de CaPe no Brasil variou de 2,9 a 6,8 afetados a cada 100.000 homens, correspondendo a cerca de 2,1% de todos os cânceres que afetam os homens no país. Essa incidência flutua de acordo com a região analisada, sendo os casos mais comumente relatados em estados da região Norte e Nordeste. Juntas, estas regiões respondem por 53% dos casos de CaPe registrados no país (FAVORITO et al., 2008; REIS et al., 2010; PAIVA et al., 2015).

A disparidade na incidência da doença entre países em desenvolvimento e desenvolvidos evidencia sua associação com fatores socioeconômicos, sendo, portanto, considerada um problema de saúde pública (COSTA et al., 2013; TORBRAND et al., 2016). No Brasil, esta diferença torna-se mais evidente à medida que a doença responde por apenas 1,2% dos cânceres que afetam os homens nas regiões Sul e Sudeste, e chega

a representar 5,7% dos cânceres em homens nas regiões Norte e Nordeste (FAVORITO et al., 2008).

Em um estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) em 2007, o estado de São Paulo esteve em primeiro lugar no *ranking* de incidência no Brasil, respondendo por 24,26% dos casos registrados no país. Em segundo lugar, esteve o estado do Ceará, com 12,87% dos casos, seguido do Maranhão, com 10,66%. Um ano após este levantamento, Favorito e colaboradores (2008) reafirmaram a alta incidência principalmente no estado de São Paulo e Maranhão. No entanto, a posição de São Paulo nesses estudos pode ser justificada pelo grande número de pacientes que se deslocam para o estado em busca de melhores opções terapêuticas, além do viés da alta densidade demográfica do estado (IBGE, 2017).

Em contraste, o estado do Maranhão historicamente possui características socioeconômicas de caráter rural, sendo marcado por intensas desigualdades sociais e extrema pobreza (IBGE, 2010). Nesse cenário, o acesso à saúde básica principalmente nas zonas rurais é escasso, dificultando a realização de consultas periódicas e consequentemente impossibilitando o diagnóstico precoce de uma série de doenças, dentre estas, tumores de pênis.

Apesar dos levantamentos nacionais feitos pela SBU e Favorito e colaboradores (2008), estes estudos não retratam de forma fidedigna a incidência da doença, principalmente no Norte e Nordeste. Nestas regiões, de acordo com levantamentos em estudos locais, acredita-se que o número de casos seja ainda maior. No Maranhão, a incidência de CaPe permaneceu incerta durante anos, mascarando o real panorama da doença no estado. Isso se deve principalmente à falta de serviços de referência, o que dificulta a triagem efetiva desses pacientes (FAVORITO et al., 2008).

Na tentativa de descrever a incidência da doença no estado do Maranhão, Coelho e colaboradores (2018) publicaram um estudo epidemiológico intitulado “*Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally?*”. Este trabalho descreveu 392 pacientes diagnosticados com CaPe entre 2004 e 2014 no Maranhão. Apesar da pesquisa ter sido realizada em um único hospital do Estado, o cálculo da *Age-standardized incidence rates (ASR)* revelou uma incidência local de 6,1 afetados por 100.000 homens em um intervalo de cinco anos, a maior já registrada no Brasil e no mundo de acordo com a IARC (*International Agency for Reserach on Cancer*). Quando

avaliada em um intervalo de 11 anos, essa mesma incidência sobe para 13,8 afetados para cada 100.000 homens.

O perfil epidemiológico e clínico desses pacientes é semelhante ao observado em outros trabalhos, principalmente em regiões com condições socioeconômicas similares a do Maranhão. Uma possível explicação para a alta incidência de CaPe no estado é a alta prevalência de infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), descrita por De-Sousa e colaboradores (2015), por Pereira e colaboradores (2017) e reforçada no trabalho de Coelho e colaboradores (2018). Esta alta prevalência de HPV nos tumores de pacientes do Maranhão corrobora com o observado em tumores de colo uterino, um tumor associado à infecção pelo vírus e com maior incidência também no estado do Maranhão (SILVA et al., 2011).

1.2 Características clínicas

Diferente do que se observa em outros tipos de tumores mais prevalentes na população, não há nenhum teste específico amplamente recomendado para diagnóstico de CaPe. No entanto, alguns sinais clínicos que podem contribuir para a suspeita e diagnóstico precoce desta neoplasia. Segundo a Sociedade Americana de Câncer, alterações na cor e textura da pele, presença de nódulos, feridas e úlceras persistentes com ou sem sangramento são as principais queixas associadas ao aparecimento do tumor. Além disso, podem estar presentes secreções persistentes, geralmente com odor incômodo e feridas indolores.

O diagnóstico clínico de CaPe é feito através do exame físico do pênis e palpação dos linfonodos regionais, podendo ser reforçado com a realização de biópsia excisional (PIZZOCARO et al., 2010). Após o diagnóstico clínico, a análise histopatológica caracteriza o tumor quanto ao seu sítio primário e comprometimento da região inguinal, tornando-se peça chave na classificação e determinação do estadiamento tumoral (NAM et al., 2017). De forma complementar, procedimentos como tomografia computadorizada e/ou ultrassonografia podem ser utilizados para aprimorar o diagnóstico clínico-histopatológico e investigar a presença de metástase regional ou à distância (MOSCONI et al., 2005).

Há poucas opções terapêuticas para CaPe, os métodos mais comumente utilizados são a excisão simples da lesão ou realização de penectomia (amputação do pênis) (ESCANDE et al., 2017; NAM et al., 2017). A braquiterapia e radioterapia também

podem ser adotadas, apesar de geralmente haver resistência dos tumores ao tratamento radioterápico, e os casos com boa resposta inicial têm índices significativos de recidiva local.

O comprometimento linfonodal é um evento frequente em pacientes com CaPe, geralmente associado à um quadro de prognóstico desfavorável (KOIFMAN et al., 2011). A linfadenectomia (esvaziamento linfonodal) é geralmente adotada como medida profilática, ainda que em 30 a 86% dos casos este procedimento esteja associado à alta morbidade e complicação pós-operatórias (GUIMARÃES et al., 2011; O'BRIEN et al., 2017). A prática justifica-se pelo risco de linfonodos palpáveis representarem eventos de micro metástase. No entanto, o que se observa nesses pacientes é a presença de metástase em cerca de 20% dos casos que não apresentam linfonodos palpáveis ao exame físico, enquanto que, 50% daqueles com linfonodos palpáveis não possuem metástase quando feita a análise histológica dos linfonodos após a cirurgia (DE PAULA et al., 2005; CHIPOLLINI et al., 2017). A identificação precoce de comprometimento linfonodal é crucial para avaliação prognóstica em CaPe.

Em um trabalho realizado por Couto e colaboradores (2014), cerca de 31,9% dos casos possuíam metástase linfonodal uni ou bilateral. Avaliando este mesmo parâmetro em pacientes do estado do Maranhão (Brasil), Coelho e colaboradores (2018) encontram um percentual 54% de comprometimento linfonodal. O impacto do comprometimento linfonodal pode ser observado na análise de sobrevida livre da doença (SLD), que em CaPe geralmente é de cinco anos em 80,34% dos casos com linfonodos negativos (SHAH et al., 2016; MONTIEL-JARQUÍN et al., 2017). Esse percentual cai de acordo com o número de linfonodos comprometidos (40-70% em N1; 33-50% em N2 e 20-35% em N3) (NOVARA et al., 2007), havendo uma correlação negativa entre comprometimento linfonodal (inguinal ou pélvico) e SLD.

No Brasil, de acordo com o Hospital A.C Carmargo, cerca de 90% dos pacientes procuram atendimento médico somente em estágios mais avançados, e geralmente já possuem comprometimento de linfonodos regionais. O diagnóstico tardio é geralmente atribuído ao receio em procurar diagnóstico médico assim que se iniciam os sintomas (SOUZA & MARQUES, 2015). O atraso no diagnóstico limita a conduta terapêutica e a realização de penectomias torna-se “padrão ouro” no tratamento da doença, gerando consequências físicas e psicológicas danosas aos pacientes (RAPOSO et al., 2016).

1.3 Classificação Histopatológica

No âmbito histológico, grande parte dos casos de CaPe apresentam-se como carcinomas de células escamosas (CECs) de caráter invasivo (SHANCHEZ et al., 2015). Os CECs representam cerca de 95% dos casos de CaPe, geralmente com lesões originando-se na glândula (80% dos casos), prepúcio (15%) ou sulco coronal (5%) (POMPEO et al., 2006; WHO, 2016).

Uma pequena parcela desses tumores são carcinomas *in situ* (5%), que também são lesões malignas do epitélio escamoso, no entanto, possuem crescimento restrito ao sítio primário da lesão, não havendo comprometimento das estruturas adjacentes (MICALI et al., 2006). O carcinoma *in situ* quando restrito à glândula, prepúcio ou haste do pênis, é chamado de Eritroplasia de Queyrat, e quando há envolvimento da pele da haste do pênis, escroto e períneo, é chamado de Doença de Bowen (Begliomoni, 2001).

Os casos de CaPe assemelham-se a carcinomas epidermóides de outros sítios, com perda da diferenciação celular da camada basal em direção à apical, e geralmente com aspectos bem ou moderadamente diferenciados (POMPEO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2009). Aos caracteres macroscópicos, os tumores possuem aparência variável, de lesões nodulares ulceradas e/ou vegetantes e com padrões de crescimento exofítico e/ou endofítico.

Diversos subtipos histológicos são descritos para CaPe, com bastante heterogeneidade quanto a padrões de crescimento, agressividade e prognóstico. Há maior prevalência do subtipo usual (45-65%), seguido do subtipo papilífero (5-15%), basalóide (4-10%), condilomatoso (7-10%), verrucoso (3-8%), além da ocorrência de tumores com características de mais de um subtipo histológico (mistos) (HANKENBER et al., 2015).

Há duas possíveis vias descritas para tumorigênese de CaPe: uma relacionada à infecção por HPV de alto risco, e outra não relacionada a HPV (geralmente atrelada a processos de inflamação crônica) (KAYES et al., 2007). Dessa forma, a classificação histopatológica desses tumores foi dividida entre subtipos que se correlacionam com a presença do vírus e os que geralmente não se observa infecção por HPV (Tabela 1).

Tabela 1. Subtipos histológicos em câncer de pênis.

CECs não relacionados ao HPV	
1.	CEC tipo usual
2.	CEC pseudohiperplásico
3.	CEC pseudoglandular
4.	CEC verrucoso
5.	CEC papilífero
6.	CEC adenoescamoso
7.	CEC sarcomatóide
8.	CEC misto
CECs Relacionados ao HPV	
1.	CEC basalóide CEC misto (papilífero-basalóide)
2.	CEC Warty-basalóide
3.	CEC condilomatoso CEC misto (condilomatoso-basalóide) CEC de células claras
4.	CEC linfopitelioma

Fonte. Adaptado (WHO, 2018)

Em relação às características intrínsecas de cada subtipo histológico, é sabido que os aspectos dos CECs usuais variam de acordo com fatores como a localização da lesão e o grau de estadiamento, repercutindo diretamente no prognóstico deste subtipo (CHAUX & CUBILLA, 2012). A maioria dos tumores usuais é de alto grau, com presença de invasão angiolinfática e índice de mortalidade em torno de 29% dos casos (WHO, 2016). Os tumores papilíferos, no entanto, geralmente possuem lesões irregulares, de aspecto papilar ou verruciforme, com padrão de crescimento exofítico, rara ocorrência de metástase e prognóstico favorável (CHAUX & CUBILLA, 2012).

Os CaPe subtipo basalóide macroscopicamente são lesões sólidas, ulcerativas e de padrão inespecífico (CUBILLA et al., 2000). Esses tumores são considerados agressivos e de prognóstico desfavorável, pois apresentam alto grauamento histológico, invasões profundas nos corpos cavernosos, frequente comprometimento angiolinfático e ocorrência de metástase linfonodal precoce (CHAUX et al., 2011; WHO, 2016). Já os

tumores condilomatosos possuem crescimento lento, com lesões de crescimento exofítico e com aspectos verruciformes. Os CECs condilomatosos são fortemente associados à infecção por HPV (hipergranulose e coilocitose), rara ocorrência de metástase e prognóstico favorável (CHAUX et al., 2010). Os CECs verrucosos são exofíticos, de aspecto papilomatoso, bem diferenciados (JHONSON et al., 1995) e geralmente negativos para HPV. Na grande maioria dos casos, esses tumores possuem crescimento lento, sem ocorrência de metástase e prognóstico favorável (LI, 2015).

O sistema de classificação recomendado para CaPe é o TNM (Tabela 2), proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) em cooperação com a *Union for International Cancer Control* (UICC). Esse sistema leva em consideração as características do tumor primário (T), o comprometimento de linfonodos regionais (N) e a ocorrência de metástase à distância (M). O agrupamento destas informações possibilita a avaliação do estadiamento tumoral (PIZZOCARO et al., 2010).

Tabela 2. Sistema TNM para estadiamento de câncer de pênis de acordo com AJCC e IUAC.

(T) Tumor primário	CRITÉRIO
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidências de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (Neoplasia intra-epitelial do pênis – PeIN)
Ta	Carcinoma de células escamosas, localizado e não invasivo
T1	Glande: tumor invade a lâmina própria Prepúcio: tumor invade a derme, lâmina própria ou dartos. Haste: tumor invade o tecido conectivo entre a epiderme e corpos cavernosos independentemente da localização. Todos os sítios com ou sem invasão linfática ou perineural, sendo de alto grau ou não.
T1a	Tumor sem invasão linfática e perineural, não sendo de alto grau (Grau 3 ou sarcomatóide)
T1b	Tumor apresenta invasão linfática e/ou invasão perineural ou é de alto grau (grau 3 ou sarcomatóide).
T2	Tumor invade o corpo esponjoso (tanto na glande quanto na parte ventral da haste do pênis), invadindo ou não o trato uretral.
T3	Tumor invade os corpos cavernosos (incluindo túnica albugínea), invadindo ou não o trato uretral.
T4	Tumor invade os tecidos adjacentes (escroto, próstata, osso púbico)

(N) Linfonodos Regionais*	
Nx	Metástase para linfonodos não pode ser avaliada
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	≤ 2 metástase inguinal unilateral, sem ENE
N2	≥ 3 metástase inguinal unilateral ou bilateral
N3	ENE da metástase linfonodal ou metástase para linfonodos pélvicos.
(M) Metástase	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância
Estadiamento	
0is	Tis, N0, M0
0a	Ta, N0, M0
I	T1a, N0, M0
IIa	T1b, N0, M0
IIa	T2, N0, M0
IIb	T3, N0, M0
IIIa	T1-3, N1, M0
IIIb	T1-3, N2, M0
IV	T4, N +, M0
IV	Tis-T4, N3, M0
IV	Tis-T4, N+, M1
Grau de Diferenciação	
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado
G4	Indiferenciado

(*) Classificação histopatológica de linfonodos. **Fonte.** AJCC, 2018.

1.4 HPV & câncer de Pênis: aspectos gerais

A associação entre infecção pelo HPV e o desenvolvimento de CaPe vem sendo cada vez mais evidenciada à medida que se observa alta positividade para o vírus nesses tumores (AFONSO et al., 2017). De acordo com o método de detecção, cerca de 60% a 90% dos casos de CaPe são positivos para HPV, sendo os subtipos mais prevalentes o 16, 18, 31 e 33 (LEBELO et al., 2014; ALEMANY et al, 2016). Como citado anteriormente,

alguns subtipos histológicos associam-se mais a presença do vírus. CaPe condilomatosos tendem a ser positivos para o HPV (THAPA et al., 2017), enquanto os basalóides chegam a 66,3% de positividade e os verrucosos parecem não estar associados a infecção pelo vírus, com positividade em 22,4% dos casos (STRATTON et al., 2016).

A prevalência do HPV em CaPe parece acompanhar a prevalência local de infecção por HPV em indivíduos saudáveis. Em uma revisão feita por Backes et al. (2009) a prevalência global de HPV em CaPe foi de 47,9%, variando de 39,7% (América do Sul) a 59,3% (Ásia). Na África, a prevalência de HPV em certas regiões pode chegar a 100% (YANG et al., 2015). Corroborando com os achados de incidência de CaPe, onde países da África, Ásia e América do Sul são os com maior prevalência de infecção pelo vírus (BLEEKER et al., 2009; CHRISTOULIDOU et al., 2015; MARTEL et al., 2017).

Em estudos realizados no Brasil, a positividade para o vírus nesses tumores varia de acordo com a região estudada. No Rio de Janeiro, em trabalhos realizados por Scheiner e colaboradores (2008) e Afonso e colaboradores (2012), a positividade para HPV em CaPe oscilou de 60 a 75%, sendo mais frequentemente encontrado o subtipo viral 16, classificado como de alto risco oncogênico. No estado do Maranhão, o primeiro estudo com tumores de pênis e HPV foi conduzido por De-Sousa e colaboradores (2015), onde foi possível identificar a presença do vírus em 63,15% dos tumores avaliados, sendo mais frequentes os subtipos 16, 18, 45 e 69. Posteriormente, Martins et al. (2018) detectaram o vírus em 89,1% dos tumores avaliados no Maranhão, dos quais os subtipos virais mais frequentes encontrados foram o 16 e 18.

Diante da alta prevalência de HPV em CaPe, a detecção do vírus torna-se crucial para melhor compreensão dos aspectos etiológicos dos tumores, além da estratificação de risco, pois entre os tumores positivos, aqueles que apresentam subtipos virais de alto risco oncogênico possuem maior agressividade (INCA, 2017). Entretanto, a infecção parece conferir vantagem prognóstica quando comparados grupos de tumores positivos e negativos para o vírus. Observa-se um aumento de até cinco anos na sobrevida geral dos pacientes com tumores positivos em relação aos casos negativos (ANG et al., 2010; KOERBER et al., 2014), sendo esta relação descrita em câncer orofaríngeal e também em pacientes com CaPe (FLAHERTY et al., 2014).

A principal dificuldade encontrada na correta estratificação dos grupos HPV positivos e HPV negativos é a metodologia utilizada para a detecção do vírus. Na literatura científica são descritos inúmeros métodos para detecção do HPV, no entanto, estes variam quanto à sensibilidade e especificidade, refletindo na oscilação de

positividade observada entre os estudos (MARTINS, 2013). A detecção por captura híbrida tem sido bastante utilizada na prática clínica e na pesquisa científica nos últimos anos, porém, limita-se à detecção somente de subtipos virais de alto risco oncogênico (RODRIGUES et al., 2009). Além desse método, hibridização *in situ*, *Southern blot* e citometria de fluxo podem ser empregados na identificação do HPV (KRIEGSMANN et al., 2017; MILLS et al., 2017).

A detecção e genotipagem do vírus com base em sequências genômicas têm sido o método mais recomendado atualmente e considerada padrão ouro no estudo de HPV (RODRIGUES et al., 2009). A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) demonstra-se eficiente tanto em sensibilidade quanto especificidade na detecção genômica do vírus em amostras biológicas. Através da amplificação *in vitro* de regiões genômicas conservadas entre os subtipos virais, com a PCR (convencional ou em tempo real) é possível realizar a detecção do HPV mesmo em amostras com carga viral baixa (DONG et al., 2017).

Do ponto de vista histológico, a observação de certas alterações citológicas também são ferramentas bastante utilizadas por patologistas na detecção do vírus em amostras tumorais e normais (PRIGGE et al., 2016). Dentre estas alterações, os coilócitos são as mais encontradas, e citologicamente caracteriza-se por vacuolização perinuclear, aumento do núcleo celular e presença de binucleações. Os coilócitos são frequentemente achados descritos em lesões pré-malignas do cólon uterino (SILVA et al., 2011).

De forma complementar, estudos recentes desmontaram a eficácia da análise de expressão da proteína p16 em pacientes com tumores associados ao HPV, pois na maioria dos casos positivos têm-se observado superexpressão dessa proteína (ADILBAY et al., 2018). A análise de expressão de p16 por imuno-histoquímica é um método economicamente viável na prática médica, e têm sido bastante utilizado em laboratórios de patologia para constatação de ação viral em tumores de pênis e em outros tumores associados ao HPV (ROMAGOSA et al., 2011). Diante dos pontos abordados, a identificação do HPV em CaPe pode ser considerado uma etapa crucial para avaliação prognóstica e elucidação etiológica desses tumores (FLAHERTY et al., 2014).

1.5 Oncogênese induzida por HPV

À medida que a ciência avança em busca da melhor compreensão da biologia do câncer, é cada vez mais comprovada a associação desta doença com a ocorrência alterações genéticas nas células (SNUSTAD & SIMMONS, 2013). Estas perturbações

genéticas tornam-se mais acentuadas à medida que afetam componentes cruciais para correta manutenção da homeostase celular.

Diante da complexidade do genoma humano e as inúmeras vias de alterações que induzem a desregulação celular e gênese tumoral, a principal dificuldade encontrada no estudo do câncer é o estabelecimento de regimes de tratamento com base nas alterações genéticas dos tumores, que geralmente possuem células de perfis heterogêneos. Esta heterogeneidade tumoral é ocasionada principalmente por acúmulo de mutações e disfunções nos mecanismos normais de divisão celular, resultado em células de padrão de crescimento e componentes genéticos variáveis (BRENNAN et al., 2015).

O conhecimento acerca da patogênese molecular de CaPe é muito limitado, especialmente quando comparado com outros cânceres. No entanto, alguns estudos têm observado várias alterações nesses tumores, tais como alterações no número de cópias gênicas (CNA, do inglês – *Copy Number Alteration*), deleções, aneuploidias, desregulação na expressão gênica, mutações gênicas, expressão proteica desbalanceada e alterações epigenéticas (KAYES et al., 2007). Essas alterações estão presentes principalmente em vias moleculares importantes para a gênese do câncer, manutenção do fenótipo tumoral e ocorrência de metástase.

Há duas possíveis vias descritas para tumorigênese de CaPe: uma relacionada à infecção por HPV de alto risco e outra não relacionada a HPV, esta última geralmente atrelada a processos de inflamação crônica. Na via associada ao HPV, as alterações assemelham-se muito as encontradas em outros tumores associados ao vírus, como câncer de cólon do útero, e câncer de cabeça e pescoço, com interrupção em rotas bioquímicas envolvendo principalmente as proteínas do retinoblastoma (pRB), p53, p16 e p21 (WHO, 2016).

Os mecanismos envolvidos na tumorigênese induzida por HPV são bem descritos em um amplo espectro de lesões malignas de cabeça e pescoço, orofaringe e principalmente em tumores do cólon uterino (BANSAL et al., 2016; GAO & SMITH, 2016; INCA, 2017). Este vírus de DNA dupla fita circularizado (BOCCARDO & VILLA, 2004) possui tropismo por tecidos cutâneos e mucosos, com um ciclo de vida dependente do processo de diferenciação das células do epitélio escamoso. O início do ciclo no hospedeiro ocorre a partir da infecção na região mais basal do epitélio, facilitada por poros gerados em microlesões teciduais na região genital. Após a infecção, o genoma do HPV

se estabiliza nas células em forma de elemento extracromossômico (epissoma) ou de forma integrada ao DNA nuclear da célula hospedeira (SOUTO et al., 2005).

Na célula hospedeira, as proteínas virais lançam mão de mecanismos complexos para induzirem à desregulação celular. O principal deste, e mais bem estudado, é o potencial oncogênico das proteínas virais E5, E6 e E7, que juntas atuam diretamente no descontrole da homeostase celular, promovendo proliferação descontrolada e transformação das células (ZUR et al., 2000). A via descreve o papel regulatório que E6 exerce sob a proteína celular p53, uma importante proteína supressora tumoral, que ao se ligar a E6 e outras proteínas acessórias, é induzida a degradação proteossômica. Também é bem elucidado o efeito de E7 sob a proteína do retinoblastoma (pRB). Esta interação leva a perda da função regulatória exercida por pRB na célula, permitindo a ativação constitutiva de fatores de transcrição e direcionamento à progressão da fase G0 para S no ciclo celular (CAMUS et al., 2007; KHATTAKA et al., 2017).

A expressão dessas oncoproteínas ocorre principalmente nas camadas basal e supra basal do epitélio, favorecendo a replicação do genoma viral nas células que estão em constante divisão (PYEON et al., 2009). Nas células mais superficiais são expressos os genes L1 e L2, codificantes de proteínas do capsídeo viral e responsáveis pela formação de novas partículas virais (FLORIN et al., 2002).

A infecção pelo HPV depende principalmente de fatores como permissividade celular, subtipo viral e condições imunológicas do hospedeiro (BLEEKER et al., 2009; DOOBAR et al., 2012). Há poucos estudos que busquem compreender o porquê de em um mesmo grupo de indivíduos infectados, uma parcela persista com a infecção (gerando lesões epiteliais ou o próprio câncer), e outra ocorra regressão natural e eliminação do vírus. Alguns estudos sugerem a idade e o tabagismo como fatores de risco para infecções persistentes (ROSITCH et al., 2013). Além disso, observa-se que, em mulheres com menos de 30 anos as infecções regredem naturalmente, ao ponto que acima dessa idade a persistência parece ser mais frequente (INCA 2017).

O estado físico do genoma do vírus na célula hospedeira também parece desempenhar um importante papel na persistência das infecções e indução de lesões. Em células do epitélio do cólon do útero, a integração do genoma do vírus ao genoma celular é descrita como uma etapa crucial para evolução de neoplasias intra-epiteliais para tumores invasivos (PETER et al., 2006). Acredita-se também que as proteínas E6 e E7 cooperem na perturbação dos mecanismos de duplicação e segregação cromossômica durante a mitose, induzindo instabilidade genômica (LIU et al., 2016).

O processo de integração ocorre geralmente por ruptura da região E2 do genoma viral (responsável por regular negativamente a expressão de E6 e E7), gerando um *feedback* positivo na expressão de E6 e E7, contribuindo para maior perturbação do ciclo celular hospedeiro e manutenção do fenótipo tumoral (AKAGI et al., 2017). A integração do genoma viral parece ocorrer mais frequentemente em regiões denominadas sítios frágeis no genoma celular (do inglês, *fragile sites*), pois estas regiões são mais suscetíveis a quebra de dupla fita do DNA (THORLAND et al., 2000; MCBRIDE & WARBURTON, 2017).

O processo de integração viral pode levar a variação no número de cópias gênicas em aproximadamente 1/3 dos sítios de integração ou em regiões proximais (AKAGI et al., 2014). Isso ocorre devido o mecanismo de *looping* durante o processo de integração, com formação de estruturas intermediárias entre o DNA viral e o DNA genômico. Entre os estudos na área, não foram encontrados padrões de integração, podendo este processo ocorrer em várias regiões genômicas de forma aleatória. No entanto, em aproximadamente 10% dos tumores de cólon do útero, a região 8q24 do genoma parece ser comprometida por integração, havendo aumento no número de cópias gênicas de *C-MYC*, um gene frequentemente superexpresso em tumores, atuando como fator de transcrição de outros genes que estimulam a proliferação celular (SHEN et al., 2017).

2. OBJETIVO

2.1 Geral

- ✓ Determinar o estado físico genômico do papilomavírus humano (HPV) e realizar análises imuno-histoquímicas em tumores de pênis.

2.2 Específicos

- ✓ Caracterizar o perfil dos pacientes com diagnóstico clínico-histopatológico de câncer de pênis quanto às variáveis clínico-epidemiológicas;
- ✓ Detectar a presença do Papilomavírus humano (HPV) em tumores de pênis;
- ✓ Identificar o estado físico do genoma do Papilomavírus humano (HPV) nos tumores positivos para o vírus;
- ✓ Avaliar a expressão da oncoproteína E6 nos tumores HPV positivos;
- ✓ Avaliar a expressão das proteínas celulares p16 e p53 nos tumores;
- ✓ Avaliar o índice de proliferação celular por meio a análise de expressão da proteína ki67;
- ✓ Identificar alterações histológicas compatíveis com a presença do Papilomavírus humano (HPV) nos tumores;
- ✓ Correlacionar os fatores associados ao HPV e o perfil de expressão proteica com os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados;

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi conduzida seguindo as regulamentações previstas na Resolução CNS/MS n.º 466/2012 para pesquisa com seres humanos, e possui aprovação pela Comissão Científica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (COMIC-HUUFMA), parecer n.º 127/2018, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da UFMA, parecer n.º 3.122.045 e CAAE n.º 05918918.9.0000.5086 (Anexo A).

3.2 Caracterização do estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental de caráter retrospectivo. Foi realizado o levantamento de casos diagnosticados com neoplasia maligna do pênis (CID 10C60) em dois hospitais de referência localizados em São Luís – MA. A pesquisa envolveu a revisão de dados clínicos e histopatológicos, detecção do papilomavírus humano (HPV) e realização de ensaios de expressão proteica por imuno-histoquímica.

3.3 Período e local

Esta pesquisa foi conduzida no Laboratório de Imuno-histoquímica e Microscopia Eletrônica (LIME) e no Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA), no período de março de 2018 a setembro de 2019.

3.4 Amostras

Os pacientes incluídos nesta pesquisa foram diagnosticados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA) e no Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB). As amostras tumorais utilizadas nas etapas experimentais deste trabalho foram provenientes do arquivo de peças cirúrgicas incluídas em parafina (FFPE) do setor de Patologia do HU-UFMA e HCAB.

3.5 Critérios de inclusão

Foram inclusos pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de câncer de pênis, maiores de 18 anos, que realizaram procedimento cirúrgico como primeira opção terapêutica e que possuíam blocos e lâminas disponíveis para revisão histológica e realização dos ensaios propostos nesta pesquisa.

3.6 Critérios de exclusão

Não foram inclusos pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de câncer de pênis com dados incompletos no prontuário médico que impossibilitavam o levantamento de dados demográficos, clínicos e laboratoriais. Também foram excluídos aqueles com ausência de material em condições adequadas para análise.

3.7 Variáveis avaliadas

As variáveis demográficas, clínicas, histopatológicas e moleculares avaliadas neste trabalho foram: idade ao diagnóstico, naturalidade, escolaridade, ocupação principal, estado civil, tabagismo, etilismo, fimose, tipo de cirurgia, topografia da lesão, tamanho da lesão, características macroscópicas do tumor, tipo e subtipo histológico, grau de diferenciação, invasão angiolinfática e perineural, tumor primário, estadiamento tumoral, presença de HPV, estado físico do HPV, expressão de p16, expressão de p53, expressão de ki67, expressão de E6, detecção de coilócitos, linfonodomegalia, metástase linfonodal, extensão extranodal, tempo de seguimento.

3.8 Etapas do estudo

3.8.1 Levantamento de casos

Foi realizado levantamento de casos com diagnóstico clínico e histopatológico de câncer de pênis no Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB) e no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA), em São Luís (MA) entre 2008 e 2019. O

levantamento foi conduzido a partir da busca por laudos emitidos pelo setor de patologia de ambas as unidades hospitalares.

3.8.2 Revisão de lâminas

Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, os casos selecionados foram submetidos à revisão criteriosa das lâminas de HE de todos os espécimes para confirmação do diagnóstico histológico e classificação dos tumores de acordo com os critérios propostos pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), 8ª edição. Todos os tumores foram avaliados por dois patologistas, em caso de discordância, os critérios foram revistos em conjunto.

3.8.3 Seleção de área tumoral

Após a análise do conjunto de lâmina de HE dos tumores de cada paciente, foi selecionada uma área representativa do tumor que contivesse no mínimo 70% de células tumorais. A mesma área selecionada foi utilizada para as análises de imuno-histoquímica e extração de DNA para detecção do HPV.

3.8.4 Expressão proteica por imuno-histoquímica

Para análise de expressão proteica por imuno-histoquímica foi utilizado o kit Dako *EnVision*TM e processamento em equipamento *PT Link* (DAKO). Inicialmente os blocos com áreas representativas do tumor de cada paciente foram refrigerados a -20°C por 60 minutos. Para cada bloco, foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram dispostos em lâminas silanizadas próprias para imuno-histoquímica. As lâminas foram incubadas em estufa por 30 minutos a 60°C para remoção do excesso de parafina (desparafinização). Após esta etapa, as lâminas foram imersas em solução de recuperação contendo *Dako Target Retrieval Solution (10x)* diluído numa proporção de 1:10 em água destilada, e submetidas a ciclagem de temperatura no *PT Link* de acordo com protocolo padrão disponibilizado pelo fornecedor (pré-aquecimento a 65°C; recuperação antigênica a 97°C por 20 minutos; arrefecimento para 65°C).

Em seguida as lâminas foram lavadas em *Dako Wash Buffer (1x)* por cinco minutos. Posteriormente foram realizadas as seguintes etapas: bloqueio de peroxidase endógena (5 min), aplicação de anticorpo primário monoclonal para cada marcador avaliado (60 min); aplicação de polímero (20 min); revelação em cromógeno 3,3' Diaminobenzidina (DAB) (10 min), contra coloração em Hematoxilina de Harris (5 min) e montagem das lâminas para análise em microscópio óptico.

A análise de expressão proteica foi realizada de forma semi-quantitativa por dois patologistas, seguindo as metodologias propostas por Cubilla et al., (2011), para análise de p16, Berdjis et al., (2005), para análise de ki67, por Lopes et al., (2002), para análise de p53 e por Lin et al., (2010), para análise de E6. As especificações dos anticorpos monoclonais utilizados estão dispostas na tabela 3.

Tabela 3. Especificações dos anticorpos utilizados nos ensaios de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Clone	Espécie	Fornecedor	Diluição	Marcação
Anti-p16	<i>IHC116</i>	Camundongo	<i>INOPAT</i>	1:100	Nuclear/citoplasmática
Anti-p53	<i>DO-7</i>	Camundongo	<i>Dako</i>	Pronto para uso	Nuclear
Anti-ki67	<i>MIB-1</i>	Camundongo	<i>Dako</i>	Pronto para uso	Nuclear
Anti-E6	<i>C1P5</i>	Camundongo	<i>Abcam</i>	1:200	Citoplasmática

3.8.5 Extração de DNA

Para obtenção de material genético (DNA) de tecido FFPE, foram realizados três cortes de 10 µm de cada material parafinado e transferidos para um microtubo de 2,0 mL. Foi adicionado 1,0 mL de xilol em cada amostra, as quais foram incubadas por 5 minutos a 50°C para remoção do excesso de parafina (repetindo este processo três vezes). As amostras foram centrifugadas a 14.000 RPM por 2 minutos, após esta etapa foi descartado o sobrenadante, sendo o mesmo procedimento realizado três vezes. Posteriormente adicionou-se 1,0 mL de etanol em cada amostra, as quais foram centrifugadas novamente a 14.000 RPM por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e repetiu-se a lavagem com etanol por três vezes. Após a última lavagem com etanol as amostras foram incubadas à 37°C em termobloco por 40 minutos para secagem. Em seguida foram submetidas as etapas de isolamento de DNA por meio do kit *QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen Cat No/ ID 56404)*, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras foram diluídas em 50 µL de tampão de eluição e avaliadas quanto à qualidade de extração através de quantificação em

espectrofotômetro *NanoDrop*®, com concentrações expressas em ng/μL, e avaliação de pureza com medidas 260/280 (entre 1,8 e 2,0) e 260/230 (acima de um). As amostras de DNA foram armazenadas em freezer -20°C para posteriores análises.

3.8.6 Detecção do Papilomavírus Humano (HPV)

3.8.6.1 Análise histológica

O diagnóstico histológico do HPV foi realizado através da identificação de coilocitose, seguindo os três principais critérios propostos por Abadi et al., (1998): (1) Presença de halo perinuclear; (2) atipia nuclear; (3) presença de binucleações.

3.8.6.2 Análise molecular

As amostras de DNA tumorais de cada paciente foram submetidas à um controle de qualidade de amplificação, sendo inicialmente submetidas à PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qualitativa para o gene da β-globina (fragmento de 268 pb). As amostras positivas para β-globina foram submetidas a detecção do HPV por PCR em duas etapas (PCR *nested*). Na primeira PCR foi utilizado um conjunto de *primers* genérico denominados PGMY09/11, descrito por GRAVITT et al. (2002), que produzem um fragmento de 450 pb da região L1 do capsídeo do HPV. Na segunda PCR foram utilizados os *primers* GP5+/6+ (JACOBS et al., 1997), que geram um *amplicon* de 170 pb, também correspondente a região L1 do capsídeo viral, estando contido no fragmento de 450 pb amplificado na primeira rodada de PCR. As sequências dos primers utilizados estão contidas na tabela 4, e as condições de preparo e termociclagem para cada conjunto de primers estão descritas na tabela 5.

Tabela 4. *Primers* utilizados para detecção do HPV nas amostras de câncer de pênis.

Conjunto de <i>primers</i>	Nome dos <i>primers</i>	Sequência (5'-3')
PGMY 09/11	PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
	PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
	PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
	PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
	PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
	PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
	PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
	PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
	PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
	PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
	PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
	PGMY09-P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
	PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
	PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
	HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT
β-globina	GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC
	PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
GP5+/6+	GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
	GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C

Sequência de *primers* utilizados na detecção do papilomavírus humano (HPV) em amostras de câncer de pênis. O conjunto de *primers* PGMY09/11 consistem em cinco sequências *forward* (PGMY11A-E) e 13 sequências *reverse* (PGMY09F-HMB01), sendo utilizados na primeira rodada de PCR. Os *primers* GP5+/GP6+ consistem em uma simples sequência *forward* e uma *reverse*, utilizados na segunda rodada de amplificação. Os *primers* GH20 e PCO4 são sequências direcionadas a β-globin e foram utilizados como controle de viabilidade das amostras.

Tabela 5. Especificações de preparo de mix de PCR e condições de termociclagem.

Primer	Mix (1x)	Termociclagem
β-globina	12,5 µL <i>Master Mix</i> 1,5 µL solução uso GH20 1,5 µL solução uso PCO4 7,5 µL água livre de nucleases	40x { 95°C por 5 min. 95°C por 60 seg. 55°C por 60 seg. 72°C por 2 min.
	2,0 µL de DNA (50-100 ng/µL)	72°C por 8 min

PGMY 09/11	12,5 μ L <i>Master Mix</i> 0,4 μ L solução uso PGMY09 0,4 μ L solução uso PGMY11 9,7 μ L água livre de nucleases	40x { 95°C por 40 seg. 55°C por 40 seg. 72°C por 40 seg.	95°C por 5 min.
	2,0 μ L de DNA (50-100 ng/ μ L)		72°C por 8 min
GP5+/6+	12,5 μ L <i>Master Mix</i> 2,5 μ L solução uso GP5+ 2,5 μ L solução uso GP6+ 2,5 μ L água livre de nucleases	40x { 94°C por 45 seg. 54°C por 60 seg. 72°C por 40 seg.	94°C por 5 min.
	5,0 μ L do produto de PGMY		72°C por 8 min

A concentração da solução uso utilizada para cada *primer* foi de 10 μ M. Para PGMY09/11, a solução uso foi preparada a partir um *pool* de *primers* PGMY09F-HMB01 (10 μ M/ *primer*) e um *pool* de *primers* PGMY11A-E (10 μ M/ *primer*)

Os *amplicons* foram separados em gel de agarose a 1,5%, submetidos a uma tensão constante de 90V por 40 min, corados em SYBRTM Safe DNA Gel Stain e visualizados em transluminador UV. Foram considerados positivos aqueles que possuíam amplificação para β -globina e PGMY09/11 e/ou GP5+/6+.

3.8.6.3 Análise imuno-histoquímica de p16

Os ensaios de imuno-histoquímica para p16 foram realizados conforme protocolo descrito no item 4.8.4. A quantificação da expressão de p16 foi conduzida de acordo com o método proposto por Cubilla et al. (2011), seguindo os seguintes padrões de imunomarcção: (0) ausência de marcação em todas as células neoplásicas; (1) marcação irregular e descontínua em algumas células neoplásicas; (2) padrão mais extenso, mas descontínuo, com pequenos grupos de células tumorais; (3) marcação nuclear e citoplasmática contínua em todas as células tumorais. Apenas os casos classificados como padrão (3) são considerados positivos para p16.

3.9 Estado físico genômico HPV 16

A análise de estado físico do HPV foi realizada de acordo com o método HPV-IntG, que analisa diretamente o *status* físico do genoma do papilomavírus humano (HPV) por meio de *PCR Multiplex*, analisando a integridade dos genes virais E1, E2, E4, E5, E6 e E7 do subtipo de HPV 16 e 18 e verificando a ocorrência de recombinação entre o genoma celular e o genoma viral nessas regiões. As sequências de *primers* utilizados e o método *in house* de análise não foram descritos pois encontram-se em pedido de patente. As amostras analisadas foram classificadas em: integrado, epissomal e misto.

3.10 Análise de dados

Os dados foram tabulados usando Excel (*Microsoft Office 2019*) e analisados estatisticamente no *software* SPSS® v. 22 (*IBM Corp., Armonk, NY, USA*). A análise de associação entre as variáveis clínico-histopatológicas, imuno-histoquímicas e de infecção por HPV foi realizada através de testes bivariados (teste do qui-quadrado ou teste exato de fisher). O método de *Kaplan-Meier* foi utilizado para determinar a sobrevida livre de doença, e o teste *log-rank* foi aplicado para comparação entre as curvas de sobrevida. Para todas as análises foram considerados resultados significantes aqueles com $p \leq 0,05$.

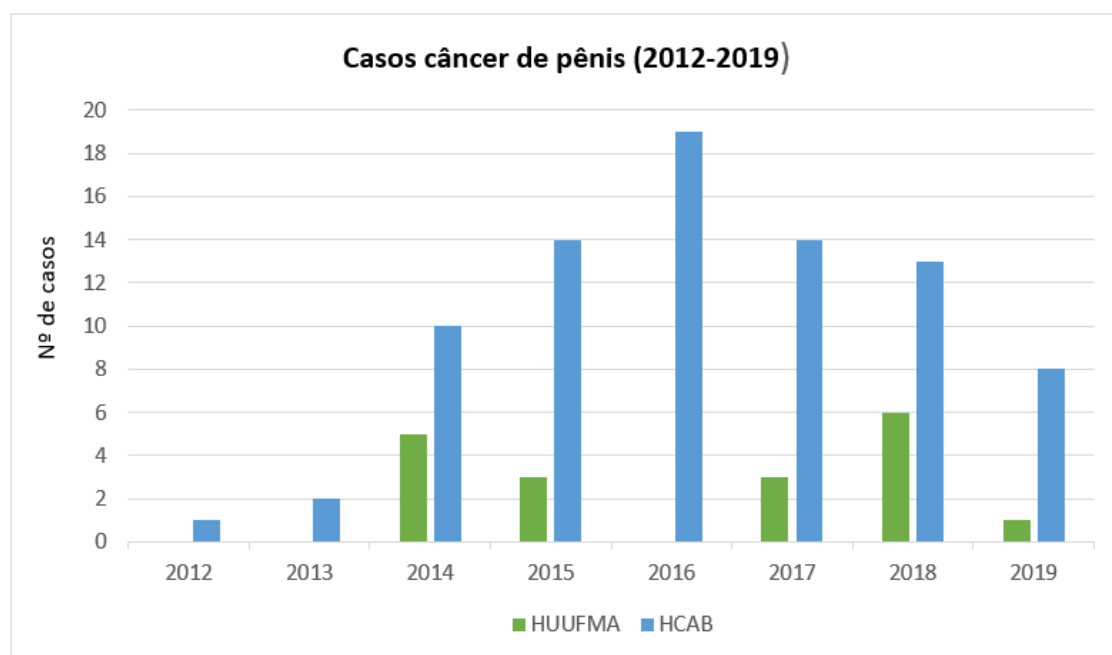
4 RESULTADOS

4.1 Levantamento de casos diagnosticados com câncer de pênis

Foi realizado levantamento de casos com diagnóstico clínico e histopatológico de câncer de pênis no Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB) e no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA), em São Luís (MA), entre 2008 e 2019. Através de análises de prontuários e laudos dos setores de patologia de ambas as unidades hospitalares, foi possível identificar 201 casos de câncer de pênis, dos quais 29 foram diagnosticados no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA) e 172 no Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB).

Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 100 casos como casuística desta pesquisa e assim realização de revisão histológica, detecção do HPV e análise imuno-histoquímica. Destes, 18 foram diagnosticados no Hospital Universitário Presidente Dutra e 82 no Hospital do Câncer Aldenora Belo, no período de 2012 a 2019 (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição de casos diagnosticados com câncer de pênis (n=100) por ano (2012-2019) no Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA) e Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB).



4.2 Perfil clínico-histopatológico

Foram avaliados 100 pacientes com diagnóstico clínico-histopatológico de câncer de pênis. As frequências absolutas e relativas de cada variável dos casos analisados estão dispostas no quadro 1. A maioria dos pacientes eram oriundos de municípios interioranos do Maranhão (86%), com idade média de $60,15 \pm 16,5$, variando de 26 a 93 anos. O perfil sociodemográfico desses pacientes foi composto grande parte por homens que atuavam como lavradores (58%), eram casados (44%) e possuíam baixa escolaridade (50%). Quando analisados os fatores de risco, 33% dos pacientes eram tabagistas, 26% etilistas e 35% possuíam prepúcio não retrátil (fimose). Cerca de 28% dos casos demoraram ≥ 1 ano para buscar atendimento hospitalar desde os primeiros sintomas da doença.

Todos os casos realizaram procedimento cirúrgico como principal método terapêutico. O tipo de cirurgia mais frequente foi a penectomia parcial, adotada em 72% dos casos, seguido da penectomia total (21%) e emasculação (7%). Macroscopicamente, as lesões em sua maioria acometiam simultaneamente a glândula e o corpo do pênis (54%), e em um grande grupo a lesão centrava-se apenas na glândula (42%). O tamanho das lesões variava entre 0,5 e >10 cm, sendo mais frequentes lesões entre 2,1-5,0 cm, com padrão de crescimento exofítico e vegetante.

Na análise microscópica, todos os tumores foram classificados como carcinoma de células escamosas (CEC) do pênis (carcinoma epidermóide), os quais se enquadravam nos seguintes subtipos histológicos: usual (31%), condilomatoso (30%), basalóide (4%), tumores com padrão histológico misto (28%) e outros (7%). Quanto ao grau de diferenciação tumoral, a maioria dos casos eram tumores pouco diferenciados (G3-43%), seguido de tumores moderadamente diferenciados (G2-33%), com ausência de invasão angiolinfática (72%) e ausência de comprometimento perineural (62%).

Na classificação do tumor primário (T), linfonodos inguinais (N) e metástase à distância pelo sistema TNM (8ª Edição), a maioria dos tumores eram pT3 (56%), com lesões que infiltravam corpo cavernoso e/ou túnica albugínea. Cerca de 88% dos casos foram pNx, pois não realizaram linfadenectomia no momento da amputação. No entanto, 44% (n=44) dos pacientes foram submetidos posteriormente a este procedimento, principalmente a linfadenectomia bilateral (29/44). Na análise histológica, 63,6% (28/44) apresentaram metástase linfonodal, dos quais em 82,1% (23/28) havia extensão

extranodal do tumor (82,1%). Durante a avaliação clínica, 40% dos casos apresentaram linfonodomegalias inguinais. Em 96% dos casos não foi possível avaliar a presença de metástase a distância (pMx), um paciente foi classificado como pM1 e em três não havia informação disponível no prontuário.

Quadro 1. Perfil clínico-histopatológico dos 100 pacientes com câncer de pênis avaliados no presente estudo.

Variável	N (%)	Variável	N (%)	Variável	N (%)	Variável	N (%)
Naturalidade		Ocupação principal		Topografia		Subtipo histológico	
São Luís (MA)	14 (14)	Lavrador	58 (58)	Glande	42 (42)	Condilomatoso	30 (30)
Interior (MA)	86 (86)	Outros	42 (42)	Glande e corpo do pênis	54 (54)	Usual	31 (31)
Escolaridade		Etilismo		Corpo	3 (3)	Basalóide	4 (4)
Analfabeto	26 (26)	Sim	26 (26)	Outros	1 (1)	Misto*	28 (28)
Fundamental incompleto	24 (24)	Não	23 (23)	Tamanho da lesão		Outros	7 (7)
Fundamental completo	06 (6)	ND	51 (51)	0,5 – 2,0 cm	7 (7)	Grau de diferenciação	
Ensino médio incompleto	03 (3)	Fimose		2,1 – 5,0 cm	56 (56)	(G1) Bem diferenciado	14 (14)
Ensino médio completo	01 (1)	Sim	35 (35)	5,1 – 10,0 cm	34 (34)	(G2) Moderadamente diferenciado	33 (33)
ND	40(40)	Não	21 (21)	> 10 cm	2 (2)	(G3) Pouco diferenciado	43 (43)
Estado civil		Outros	44 (44)	ND	1 (1)	(G4) Indiferenciado	8 (8)
Casado e/ou união estável	44 (44)	Início dos sintomas		Características da lesão		ND	2 (2)
Solteiro	31 (31)	≥ 1 ano	28 (28)	Ulcerada	27 (27)	Invasão angiolinfática	
Outros	15 (15)	≤ 1 ano	26 (26)	Vegetante e/ou Verrucosa	38 (38)	Presente	25 (25)
ND	10 (10)	ND	46 (46)	Ulcero-vegetante	23 (23)	Ausente	72 (72)
Tabagismo		Tipo de cirurgia		Outros	12 (12)	ND	3 (3)
Sim	33 (33)	Penectomia parcial	72 (72)	Tipo histológico		Invasão perineural	
Não	34 (34)	Penectomia total	21 (21)	Carcinoma epidermóide	100 (100)	Presente	36 (36)
ND	33 (33)	Emasculação	7 (7)			Ausente	62 (62)
						ND	2 (2)

Variável	N (%)	Variável	N (%)	Variável	N (%)	Variável	N (%)
Tumor primário (pT)		Linfonodos (pN)		Metástase à distância (pM)		Estadiamento	
pT1a	10 (10)	pN0	1 (1)	pM1	1 (1)	I	10 (10)
pT2	25 (25)	pN1	0 (0)	pMx	96 (96)	IIa	24 (24)
pT3	56 (56)	pN2	1 (1)	ND	3 (3)	IIb	51 (51)
pT4	4 (4)	pN3	7 (7)			IIIb	1 (1)
ND	5 (5)	pNx	88 (88)			IV	9 (9)
		ND	(3)			ND	5 (5)
Linfonodomegalia		Linfadenectomia		Metástase linfonodal (n=44)		Extensão extranodal (n=28)	
Sim	40 (40)	Unilateral	15 (15)	Com metástase	28 (63,6)	Presente	23 (82,1)
Não	23 (23)	Bilateral	29 (29)	Sem metástase	16 (36,4)	Ausente	5 (17,90)
ND	37 (37)	Não realizada	56 (56)				

(ND): não disponível; (*): condilomatoso e usual (n=18), condilomatoso e basalóide (n=1), condilomatoso e acantolítico (n=1), usual e basalóide (n=7), usual com diferenciação sarcomatosa (n=1).

4.3 Detecção do papilomavírus humano (HPV)

A detecção do papilomavírus humano (HPV) foi dividida em duas etapas: análise histopatológica de alterações cito arquiteturais compatíveis com infecção viral e análise molecular (PCR) para detecção do vírus. Além destes dois métodos, a análise imuno-histoquímica da proteína p16 pode ser utilizada como marcador indireto de infecção por HPV de alto risco oncogênico. O perfil clínico-histopatológico dos casos de acordo com a presença de coilócitos, expressão de p16 e positividade molecular para HPV estão descritos na tabela 7.

Na análise histológica, cerca de 88,4% (84/95) dos casos apresentavam células coilocíticas, as quais citologicamente sugerem a presença de infecção por HPV (Figura 1). Quando avaliado o perfil clínico-histopatológico dos casos positivos para coilocitose, foi observado maior prevalência em indivíduos > 60 anos (54,8%), que realizaram penectomia parcial (71,4%), tumores que acometiam principalmente a glândula e corpo do pênis (63,1%), com padrão de crescimento vegetante (41,7%) e que mediam entre 2,1-5,0 cm (57,1%). Na análise histológica, os tumores com presença de coilócitos em geral eram moderadamente e pouco diferenciados (77,4%), com ausência de comprometimento angiolinfático (69,0%) e perineural (63,1%). No sistema de classificação TNM, esses tumores foram em sua maioria eram pT3 (60,3%) e em estágio II (81,0%). Quando avaliados os subtipos histológicos relacionados e não relacionados com infecção pelo papilomavírus humano (HPV), a presença de coilocitose foi mais prevalente no grupo associado ao vírus, havendo significância estatística ($p=0,03$). Além disso, 69% dos casos com coilocitose não possuíam invasão angiolinfática ($p=0,002$).

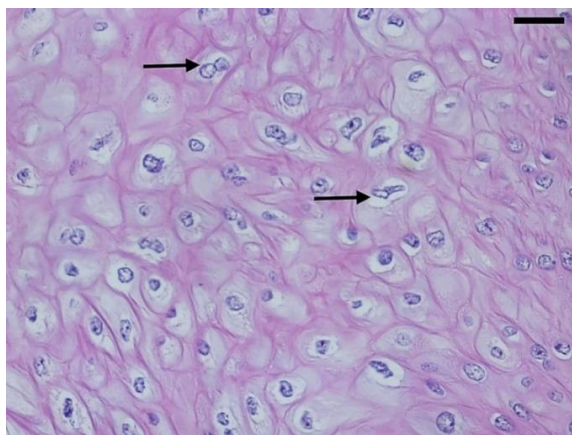


Figura 1. Corte histológico de tumor de pênis evidenciando a presença de coilócitos (seta preta) em aumento de 1000x.

A análise de expressão proteica de p16 por imuno-histoquímica foi conduzida de acordo com os critérios propostos por Cubilla et al. (2011), com os seguintes padrões de imunomarcção: (0) ausência de marcação em todas as células neoplásicas; (1) marcação irregular e descontínua em algumas células neoplásicas; (2) padrão mais extenso, mas descontínuo, com pequenos grupos de células tumorais; (3) marcação nuclear e citoplasmática contínua em todas as células tumorais (Figura 2). Apenas os casos classificados como padrão 3 foram considerados positivos para p16 e associados à infecção por HPV de alto risco.

De acordo com o método proposto por Cubilla et al. (2011), 58% dos casos avaliados no presente estudo foram positivos para p16 (Tabela 6). Quando avaliado o perfil clínico-histopatológico dos casos de acordo com a positividade para p16, grande parte dos pacientes eram > 60 anos (50%), que realizaram penectomia parcial (65,5%), tumores que afetavam simultaneamente a glândula e o corpo do pênis (70,7%), com padrão de crescimento vegetante e/ou verrucoso (39,7%) e tamanho entre 2,1-5,0 cm (51,7%). Na análise histológica, estes tumores eram principalmente de subtipos relacionados ao HPV (75,9%), moderadamente/pouco diferenciados (74,2%), sem invasão angiolinfática (70,7%) e perineural (56,9%).

Na análise estatística, a superexpressão de p16 foi associada à tumores que acometiam a glândula e corpo do pênis ($p=0,01$) e subtipos histológicos relacionados ao HPV ($p=0,05$). Quando os subtipos histológicos foram comparados isoladamente, foi observado que todos os tumores basalóides possuíam positividade para p16, e quando avaliados os tumores mistos que possuíam componente basalóide, também houve associação estatisticamente significativa com positividade para p16 ($p=0,02$).

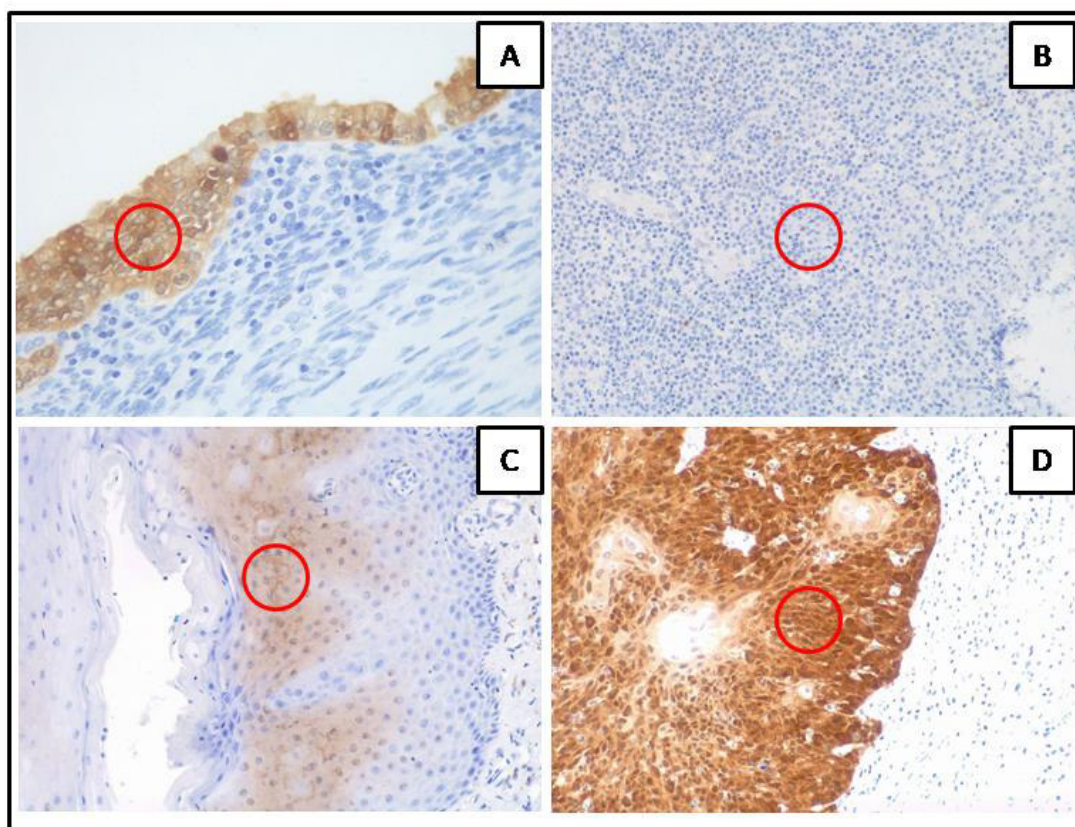


Figura 2. Expressão da proteína supressora tumoral p16 por imuno-histoquímica. Em vermelho destacou-se área representativa do índice de positividade para este marcador. (A) Carcinoma de células escamosas orofaríngeal, positivo para infecção por HPV e utilizado como controle positivo; (B) Carcinoma epidermóide peniano exibindo negatividade para p16 (padrão 0); (C) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação fraca para p16, padrão 2; (D) Carcinoma epidermóide peniano exibindo positividade (padrão 3) para p16 de acordo com Cubilla et al. (2011).

Tabela 6. Distribuição de expressão proteica de p16 nos tumores avaliados (n=100).

Marcador	Padrão de expressão	N	%
P16	0	14	14
	1	10	10
	2	18	18
	3	58	58

A detecção molecular (PCR) do HPV foi realizada em 79 pacientes, dos quais 67,1% (n=53) apresentaram positividade para o genoma viral. O perfil clínico-histopatológico desses pacientes foi composto por homens com idade > 60 anos (50,9%), que realizaram penectomia parcial como método terapêutico (71,8%), possuíam tumores

centrados na glândula e corpo do pênis (64,2%), com tamanho entre 2,1-5,0 cm (52,8%) e padrão de crescimento vegetante e/ou verrucoso (37,7%). Histologicamente, a maioria eram tumores relacionados ao HPV (71,8%), pouco diferenciados (39,6%), com ausência de invasão angiolinfática (79,2%) e perineural (58,5%). De acordo com o sistema TNM, esses tumores eram em sua maioria pT3 (60,4%) e estavam no estágio II da doença (83,0%). Não houve associação estatística significativa entre os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados e a positividade para HPV.

Quando realizada a análise de sobrevida livre da doença (SLD) pela curva de Kaplan-Meier, houve diferença no tempo de SLD entre os pacientes com tumores positivos e negativos para coilocitose (log-rank $p=0,006$) (Figura 3) e p16 (log-rank=0,03) (Figura 4-10). Os pacientes com coilocitose tiveram média de SLD de 33 meses e os sem coilocitose de 24 meses, e os pacientes negativos para p16 tiveram SLD em média de 38 meses e os positivos 21 meses. Em relação a positividade para HPV por PCR, não houve diferença significativas entre o tempo de sobrevida dos grupos (Figura 11). Quando comparados os dados de HPV, com p16 e coilocitose, cerca de 71,7% dos casos HPV positivo foram positivos para p16, sendo esta associação estatisticamente significativa ($p=0,006$).

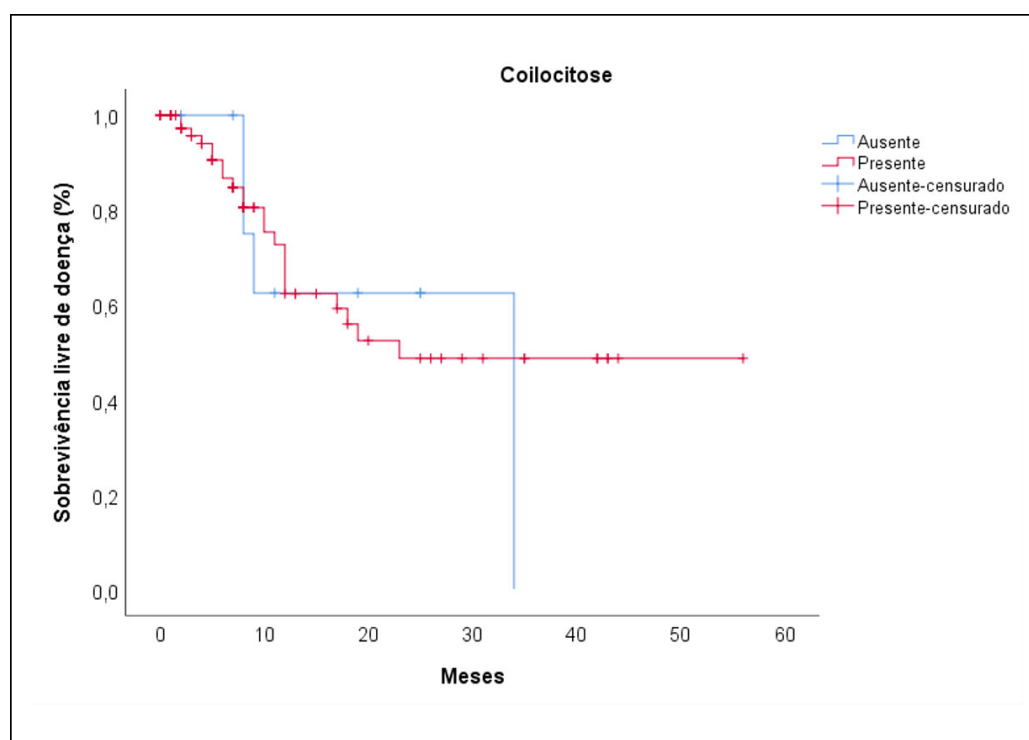


Figura 3. Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de coilocitose (log-rank $p=0,006$).

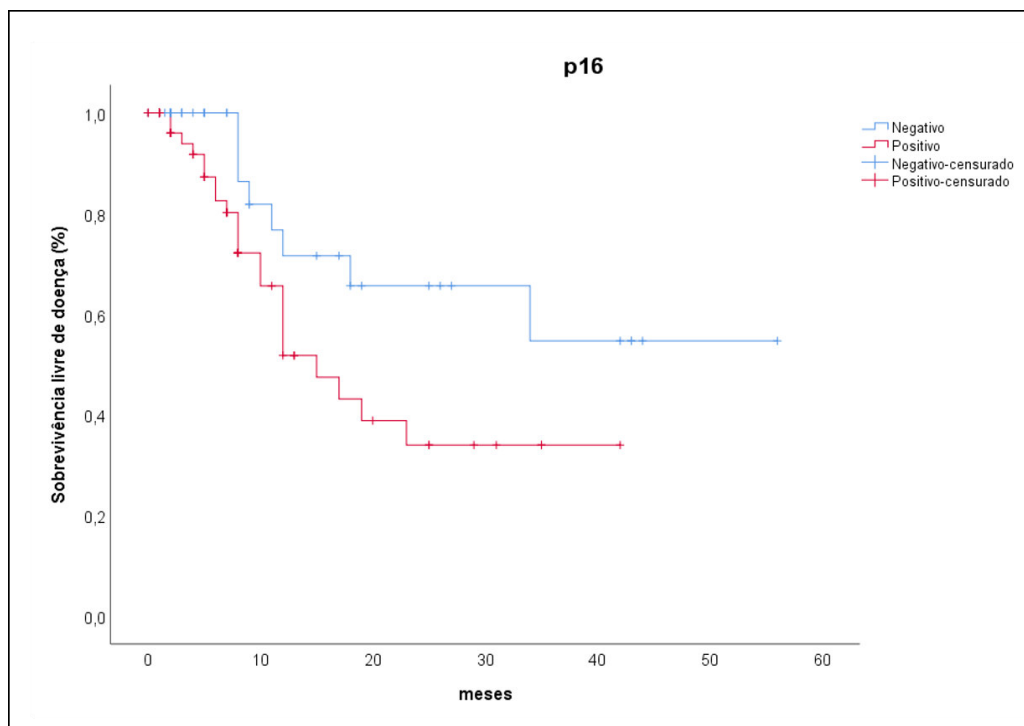


Figura 4. Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 (log-rank $p=0,03$).

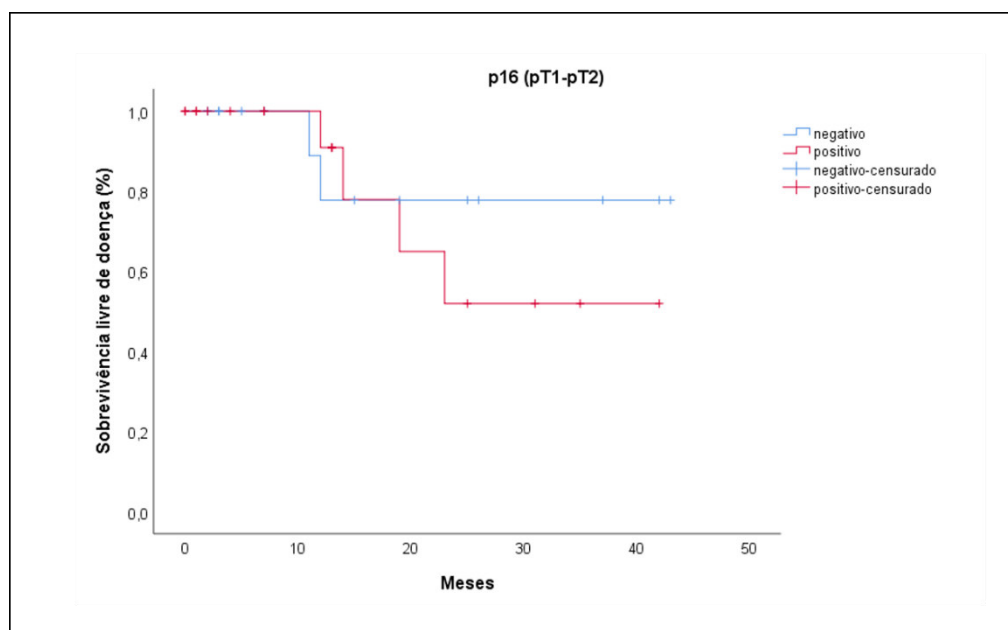


Figura 5. Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores pT1-pT2. (log-rank $p=0,51$).

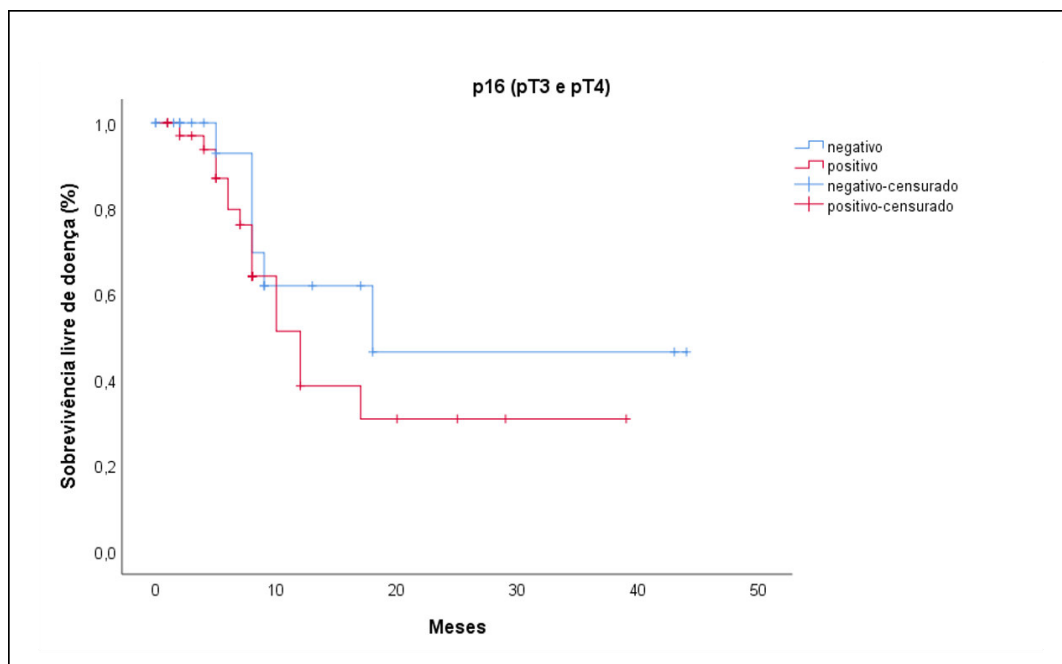


Figura 6. Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores pT3-pT4. (log-rank $p=0,32$).

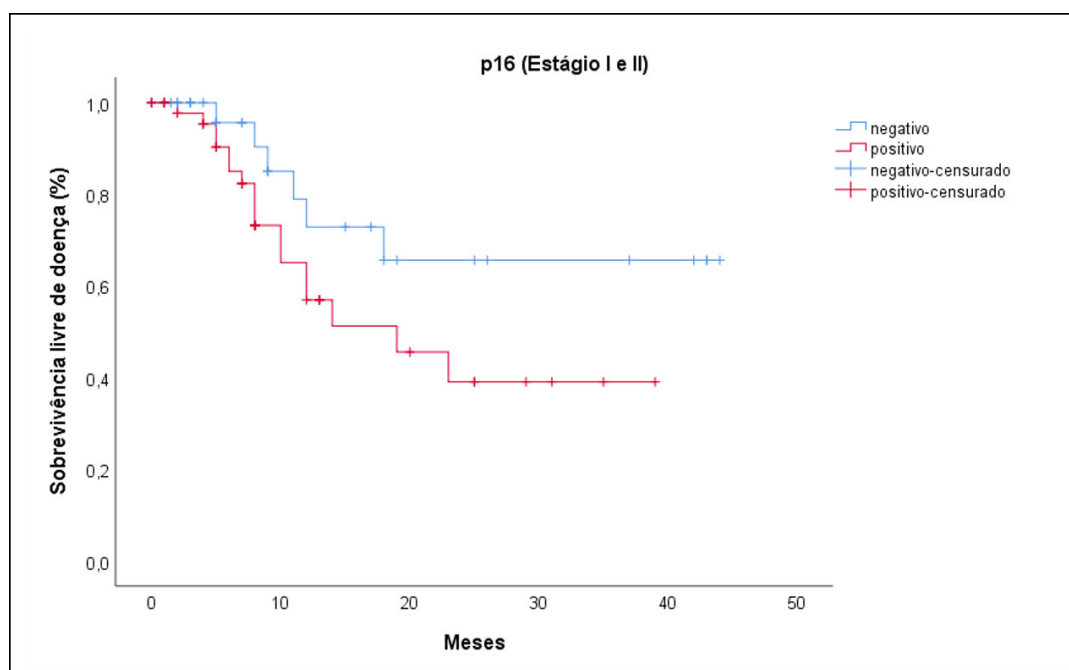


Figura 7. Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores com estágio I e II. (log-rank $p=0,09$).

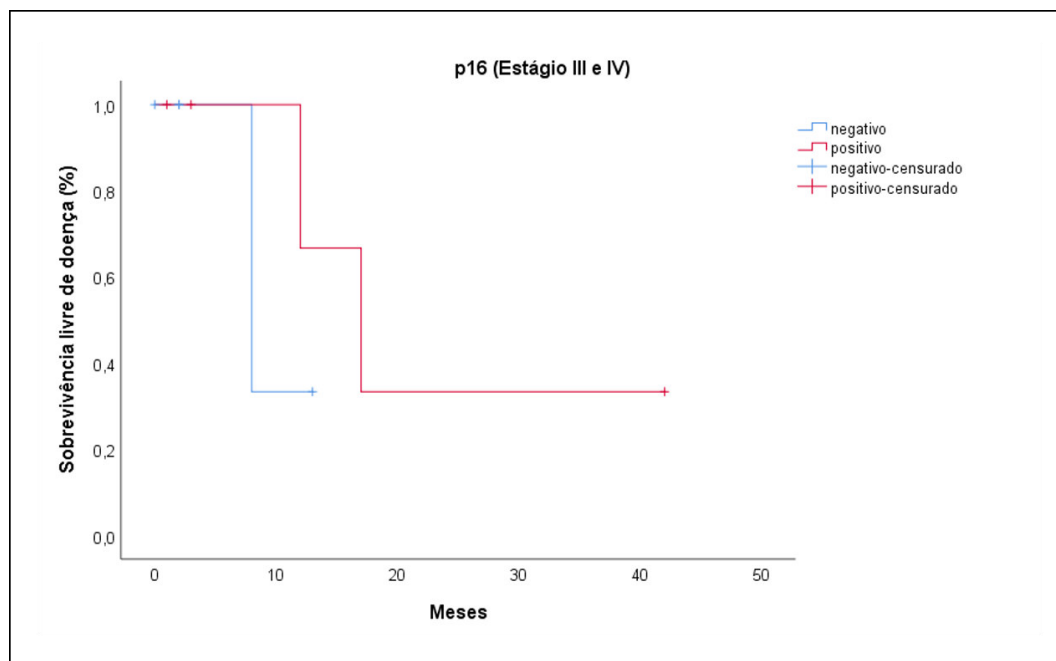


Figura 8. Análise de sobrevida livre de doença dos pacientes de acordo com a positividade para p16 em tumores com estágio III-IV (log-rank $p=0,32$).

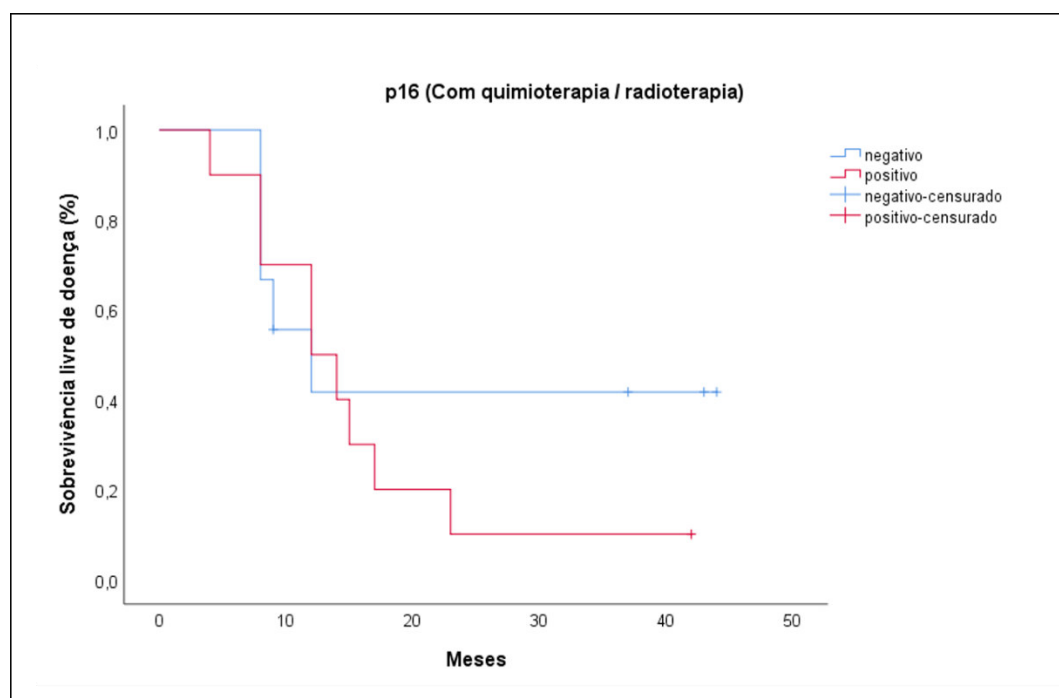


Figura 9. Análise de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de pênis submetidos a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico de acordo com a positividade para p16 (log-rank $p=0,40$).

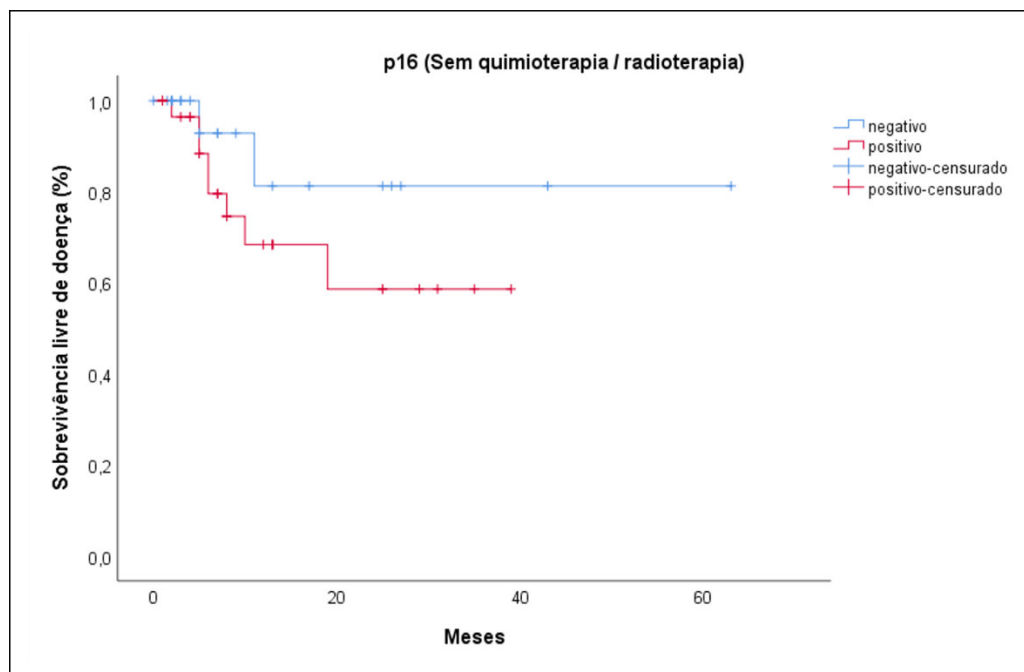


Figura 10. Análise de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de pênis que não foram submetido a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico de acordo com a positividade para p16 (log-rank $p=0,25$).

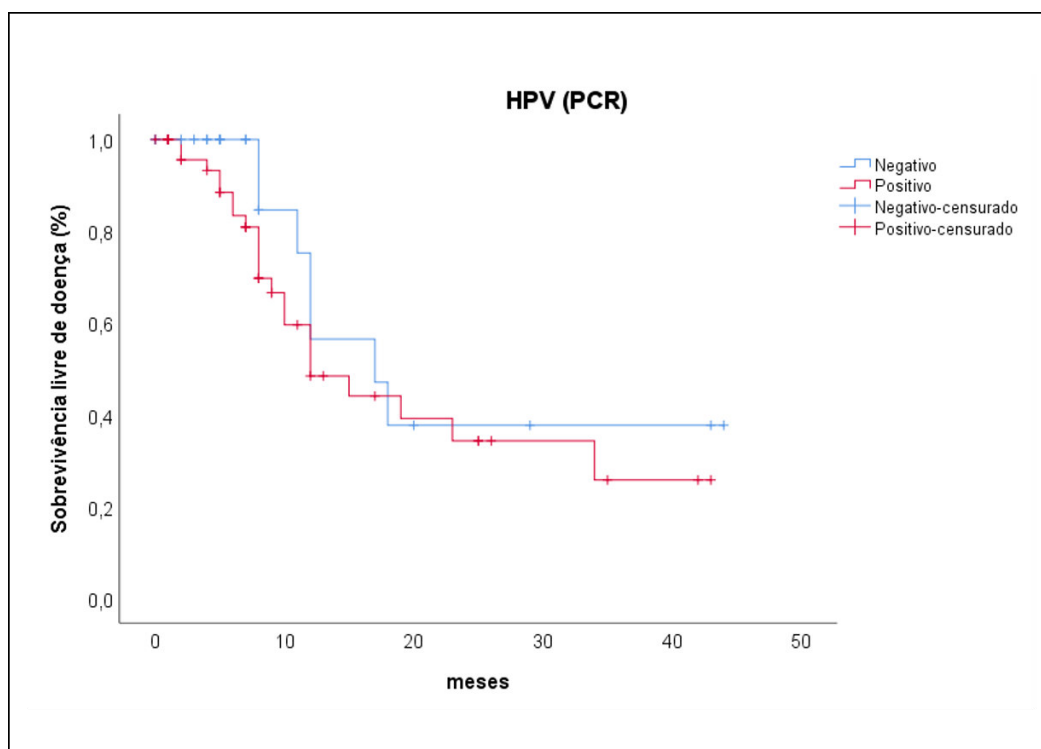


Figura 11. Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para HPV (log-rank $p=0,31$).

Tabela 7. Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com a presença de coilocitos, superexpressão de p16 e positividade molecular para HPV

Variável	Coilocitose (n=95)		P valor	P16 (n=100)		P valor	PCR (n=79)		P valor
	Presente (n= 84)	Ausente (n=09)		Positivo (n=58)	Negativo (n=42)		Positivo (n=53)	Negativo (n=26)	
Idade	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
20-40 anos	13 (15,5)	4 (36,4)	p=0,24	13 (22,4)	5 (11,9)	p=0,39	12 (22,6)	4 (15,4)	p=0,69
40-60 anos	25 (29,8)	3 (27,3)		16 (27,6)	12 (28,6)		14 (26,4)	6 (23,1)	
> 60 anos	46 (54,8)	4 (36,4)		29 (50,0)	25 (59,5)		27 (50,9)	16 (61,5)	
Tipo de cirurgia									
Penectomia parcial	60 (71,4)	9 (81,8)	p=0,08	38 (65,5)	31 (73,8)	p=0,45	38 (71,8)	15 (57,7)	p=0,4
Penectomia total	19 (22,6)	0 (0,0)		16 (27,6)	7 (16,7)		10 (18,9)	8 (30,8)	
Emasculação	5 (6,0)	2 (18,2)		4 (6,9)	4 (9,5)		5 (9,4)	3 (11,5)	
Topografia									
Glande	30 (35,7)	8 (72,7)	p=0,07	17 (29,3)	21 (50)	p=0,01	18 (34,0)	8 (30,8)	p=0,65
Glande e corpo	53 (63,1)	3 (27,3)		41 (70,7)	19 (45,2)		34 (64,2)	17 (65,4)	
Outros	1 (1,2)	0 (0,0)		0 (0)	1 (2,4)		0 (0,0)	1 (3,8)	
Tamanho da lesão (cm)									
0,5-2,0	6 (7,1)	1 (9,0)	p=0,65	4 (6,9)	3 (7,1)	p=0,69	4 (7,5)	1 (3,8)	p=1,00
2,1-5,0	48 (57,1)	5 (45,5)		30 (51,7)	26 (61,9)		28 (52,8)	14 (53,8)	
5,1-10,0 / > 10,0	29 (34,5)	5 (45,5)		23 (39,7)	12 (28,6)		20 (37,7)	10 (38,5)	
ND	1 (1,2)	0 (0,0)		1 (1,7)	1 (2,4)		1 (1,9)	1 (3,8)	
Característica da lesão									
Ulcerada	21 (25,0)	5 (45,5)		12 (20,7)	15 (35,7)	p=0,40	9 (17,0)	7 (26,9)	p=0,59

Vegetante e/ou Verrucosa	35 (41,7)	2 (18,2)	p=0,18	23 (39,7)	15 (35,7)		20 (37,7)	10 (38,5)	
Ulcerovogetante	18 (21,4)	4 (36,4)		16 (27,6)	8 (19,0)		17 (32,1)	5 (19,2)	
Outros	10 (11,9)	0 (0,0)		7 (12,1)	4 (9,5)		7 (13,2)	4 (15,4)	
Subtipo histológico									
Relacionados ao HPV	62 (73,8)	4 (36,4)	p=0,03	44 (75,9)	24 (57,1)	p=0,05	38 (71,8)	18 (69,2)	p=1,00
Não relacionados ao HPV	22 (26,2)	7 (63,2)		14 (24,1)	18 (42,9)		15 (28,3)	8 (30,8)	
Grau de diferenciação									
(G1) Bem diferenciado	12 (14,3)	2 (18,2)	p=0,88	7 (12,1)	7 (16,7)	p=0,42	7 (13,2)	4 (15,4)	p=0,69
(G2) Moderadamente diferenciado	29 (34,5)	3 (27,3)		20 (34,5)	13 (31,0)		16 (30,2)	9 (34,6)	
(G3) Pouco diferenciado	36 (42,9)	5 (45,5)		23 (39,7)	20 (47,6)		21 (39,6)	12 (46,2)	
(G4) Indiferenciado	5 (6,0)	1 (9,1)		7 (12,1)	1 (2,4)		7 (13,2)	1 (3,8)	
ND	2 (2,4)	0 (0,0)		1 (1,7)	1 (2,4)		2 (3,8)	0 (0,0)	
Invasão angiolinfática									
Presente	25 (29,8)	0 (0,0)	p=0,002	16 (27,6)	9 (21,4)	p=0,61	10 (18,9)	9 (34,6)	p=0,21
Ausente	58 (69,0)	11 (100,0)		41 (70,7)	31 (73,8)		42 (79,2)	16 (61,5)	
ND	1 (1,2)	0 (0,0)		1 (1,7)	2 (4,8)		1 (1,9)	1 (3,8)	
Invasão perineural									
Presente	31 (36,9)	5 (45,5)	p=0,74	24 (41,4)	13 (31,0)	p=0,54	21 (39,6)	10 (38,5)	p=1,00
Ausente	53 (63,1)	6 (54,5)		33 (56,9)	28 (66,7)		31 (58,5)	15 (57,7)	
ND				1 (1,7)	1 (2,4)				
Tumor primário									
pT1a	8 (9,5)	2 (18,2)	p=0,11	4 (6,8)	6 (14,3)	p=0,62	3 (5,7)	3 (11,5)	p=0,47
pT2	18 (21,4)	5 (45,5)		15 (25,9)	10 (23,8)		14 (26,4)	3 (11,5)	

pT3	52 (61,9)	3 (27,3)		35 (60,3)	21 (50)		32 (60,4)	17 (65,4)	
pT4	3 (3,6)	1 (9,1)		2 (3,4)	2 (4,8)		2 (3,8)	2 (7,7)	
ND	3 (3,6)	0 (0,0)		2 (3,5)	3 (7,1)		2 (3,8)	1 (3,8)	
Estadiamento									
I	8 (9,5)	2 (18,2)	p=0,89	4 (6,9)	6 (14,3)	p=0,39	3 (5,7)	3 (11,5)	p=0,71
II	64 (76,2)	8 (72,7)		47 (81,0)	28 (66,7)		44 (83,0)	19 (73,1)	
III-IV	9 (10,7)	1 (9,1)		5 (8,6)	5 (11,9)		4 (7,5)	3 (11,5)	
ND	3 (3,6)	0 (0,0)		2 (3,4)	3 (7,1)		2 (3,8)	1 (3,8)	
Metástase linfonodal									
Presente	22 (26,2)	4 (36,4)	p=0,31	17 (29,3)	11 (26,2)	p=0,24	17 (32,1)	6 (23,1)	p=0,44
Ausente	16 (19,0)	0 (0,0)		12 (20,7)	4 (9,5)		8 (15,1)	7 (26,9)	
Sem linfadenectomia	46 (54,8)	7 (63,6)		29 (50,0)	27 (64,3)		28 (52,8)	13 (50,0)	
Extensão extranodal									
Presente	18 (21,4)	3 (27,3)	p=0,68	14 (24,1)	9 (21,4)	p=0,31	12 (22,6)	6 (23,1)	p=1,00
Ausente	20 (23,8)	1 (9,1)		15 (25,9)	6 (14,3)		13 (24,5)	7 (26,9)	
Sem linfadenectomia	46 (54,8)	7 (63,6)		29 (50,0)	27 (64,3)		28 (52,8)	13 (50,0)	

(N) frequência absoluta; (%) frequência relativa; (p valor) Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

4.4 Expressão proteica de E6

A análise de expressão proteica de E6 por imuno-histoquímica foi conduzida de acordo com os critérios propostos por Lin et al., (2010), sendo os casos considerados positivo ou negativos (Figura 12). De acordo com esses critérios, 42 casos foram positivos (42%) e 58 foram negativos (58%) (Tabela 8). Quando avaliado o perfil clínico-histopatológico dos casos de acordo com a positividade para E6, a maioria dos pacientes eram >60 anos (50%), que realizaram penectomia parcial (71,4%), e possuíam lesões que acometiam a glândula e o corpo peniano (59,5%), com padrão de crescimento igualmente distribuído entre ulcerado (26,3%), vegetante e/ou verrucoso (26,3%) e ulcero-vegetante (26,3%) e tamanho variando entre 2,1 e 5,0 cm (61,9%). Do ponto de vista histológico, esses tumores eram principalmente de subtipos relacionados ao HPV (59,5%), pouco diferenciados (64,3%), sem invasão angiolinfática (54,8%) e com invasão perineural (50%). O perfil de expressão proteica de E6 de acordo com os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados está descrito na Tabela 9.

Tabela 8. Distribuição de expressão proteica de E6 nos tumores avaliados (n=100).

Marcador	Padrão de expressão	N	%
E6	Negativo	58	58
	Positivo	42	42
	TOTAL	100	100

(N) frequência absoluta; (%) frequência relativa

Na análise estatística, a ausência de expressão de E6 foi associada à tumores bem diferenciados ($p=0,001$), ausência de invasão angiolinfática ($p=0,001$) e perineural ($p=0,001$), estadiamento I-II ($p=0,01$) e tumores condilomatosos ($p=0,005$). A positividade para E6 esteve associada a presença de metástase linfonodal ($p=0,001$) e extensão extranodal ($p=0,02$). A positividade para E6 (variável independente) também esteve associada à metástase linfonodal (variável dependente) na análise por regressão logística binária ($p=0,037$ / OR 6,792 / IC 1,120 – 41,187).

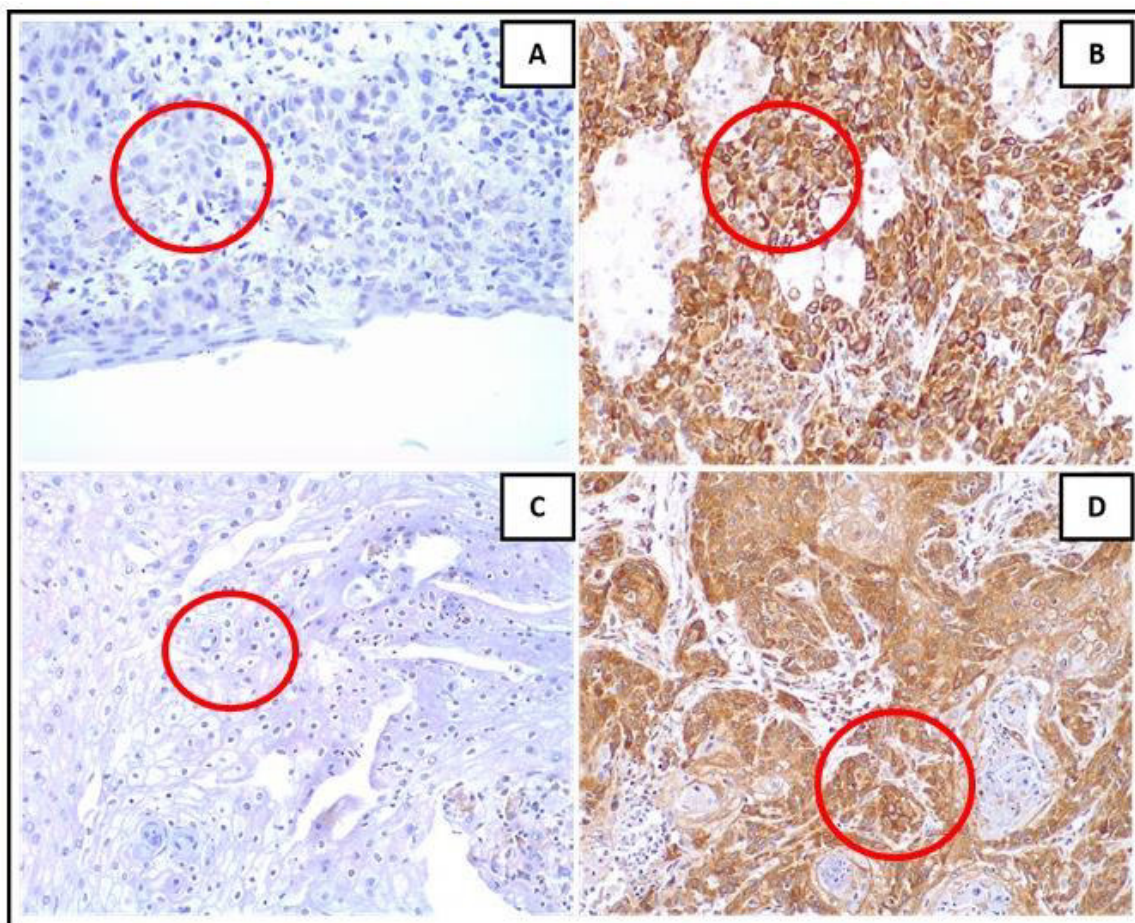


Figura 12. Expressão da proteína oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) por imuno-histoquímica em cortes histológicos. Em vermelho destacou-se área representativa do índice de positividade para este marcador. (A) Tumor de pênis negativo para E6; (B) Carcinoma epidermóide peniano positivo para E6 e utilizado como controle positivo (C) Carcinoma epidermóide peniano do tipo condilomatoso exibindo negatividade para E6 (D) Carcinoma epidermóide peniano exibindo do tipo usual, exibindo marcação positiva para E6.

Quando realizada a análise de sobrevida livre da doença (SLD) pela curva de Kaplan-Meier, houve diferença no tempo de SLD entre os pacientes com tumores positivos e negativos para E6 (Figura 13). Pacientes com tumores E6-positivos tiveram SLD diminuída em comparação aos casos negativos para E6, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa pelo teste de log-rank ($p=0,17$).

Tabela 9. Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com o perfil de expressão da oncoproteína E6-HPV.

Variável	E6 (n=100)		P valor
	Negativo (n=58)	Positivo (n=42)	
Idade	N (%)	N (%)	
20-40 anos	7 (12,3)	11 (26,3)	p= 0,22
40-60 anos	18 (31,6)	10 (23,8)	
> 60 anos	32 (56,1)	21 (50,0)	
Tipo de cirurgia			
Penectomia parcial	41 (71,9)	30 (71,4)	p=1,00
Penectomia total	16 (28,1)	12 (28,6)	
Topografia			
Glande	25 (43,9)	15 (35,7)	p=0,56
Glande e corpo	31 (54,4)	25 (59,5)	
Outros	1 (1,8)	2 (4,8)	
ND	0 (0,0)	0 (0,0)	
Tamanho da lesão (cm)			
0,5 – 2,0	4 (7,0)	3 (7,1)	p=0,78
2,1-5,0	30 (52,6)	26 (61,9)	
5,1-10,0 / > 10,0	22 (38,6)	13 (31,0)	
ND	1 (1,8)	0 (0,0)	
Característica da lesão			

Ulcerada	15 (26,3)	12 (28,6)	p= 0,32
Vegetante e/ou Verrucosa	26 (45,6)	12 (28,6)	
Ulceró-vegetante	11 (19,3)	12 (28,6)	
Outros	5 (8,8)	6 (14,3)	
Subtipo histológico			
Relacionados ao HPV	41 (71,9)	25 (59,5)	p=0,20
Não relacionados ao HPV	16 (28,1)	17 (40,5)	
Grau de diferenciação			
(G1) Bem diferenciado	13 (22,8)	1 (2,4)	p=0,001
(G2) Moderadamente diferenciado	24 (42,8)	10 (23,8)	
(G3) Pouco diferenciado	16 (28,1)	27 (64,3)	
(G4) Indiferenciado	4 (7,0)	4 (9,5)	
ND	0 (0,0)	(0,0)	
Invasão angiolinfática			
Presente	7 (12,3)	19 (45,2)	p=0,001
Ausente	49 (86,0)	23 (54,8)	
ND	1 (1,8)	(0,0)	
Invasão perineural			
Presente	16 (28,1)	21 (50,0)	p=0,001
Ausente	41 (71,9)	20 (47,6)	
ND	0 (0,0)	1 (2,4)	
Tumor primário			
pT1a	10 (17,5)	1 (2,4)	p=0,13

pT2	12 (21,1)	13 (31,0)	
pT3	31 (54,4)	25 (59,5)	
pT4	2 (3,5)	2 (4,8)	
ND	2 (3,5)		
Estadiamento			
I	10 (17,5)	1 (2,4)	
II	42 (73,7)	32 (76,2)	
III-IV	3 (5,4)	8 (19,0)	p=0,01
ND	2 (3,5)	1 (2,4)	
Metástase linfonodal			
Presente	12 (21,1)	15 (35,7)	
Ausente	13 (22,8)	3 (7,1)	p=0,001
Sem linfadenectomia	32 (56,1)	24 (57,1)	
Extensão extranodal			
Presente	9 (15,8)	13 (31,0)	
Ausente	16 (28,1)	5 (11,9)	p=0,02
Sem linfadenectomia	32 (56,1)	24 (57,1)	

(N) frequência absoluta; (%) frequência relativa; (p valor) Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

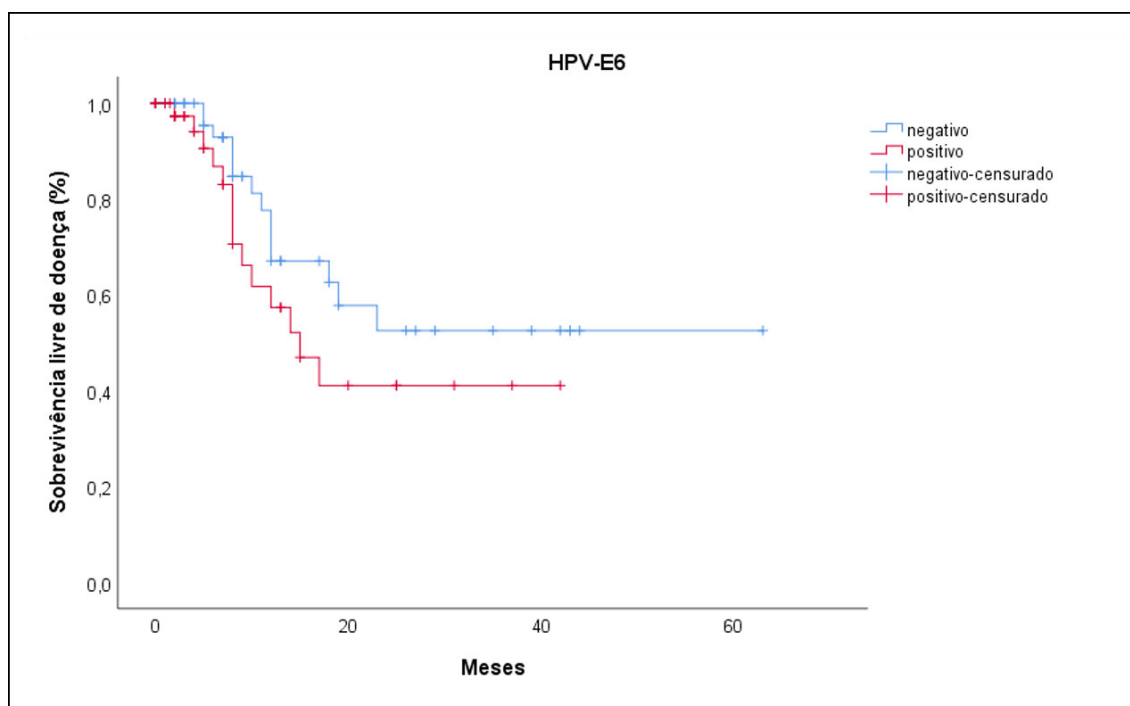


Figura 13. Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para E6 (log-rank $p=0,17$).

4.5 Expressão proteica de p53

A análise de expressão proteica de p53 por imuno-histoquímica foi conduzida de acordo com os critérios propostos por Lopes et al. (2002), onde foram considerados negativos os casos com $< 20\%$ de imuno-marcação, os casos com $> 20\%$ foram classificados em: positivo (+), com positividade entre 20-50%, e positivo (++), com positividade $>50\%$ (Figura 14). De acordo com esses critérios, 64 casos (64%) foram considerados negativos (64%) e 36 (36%) foram positivos. Dentre os casos positivos, 27 (75%) foram positivos (+) e 9 (25%) foram positivos (++) (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição de expressão proteica de p53 nos tumores avaliados (n=100).

Marcador	Padrão de expressão	N	%
P53	Negativo ($< 20\%$)	64	64
	Positivo (+) (20-50%)	27	27
	Positivo (++) ($>50\%$)	9	9

(N) frequência absoluta; (%) frequência relativa

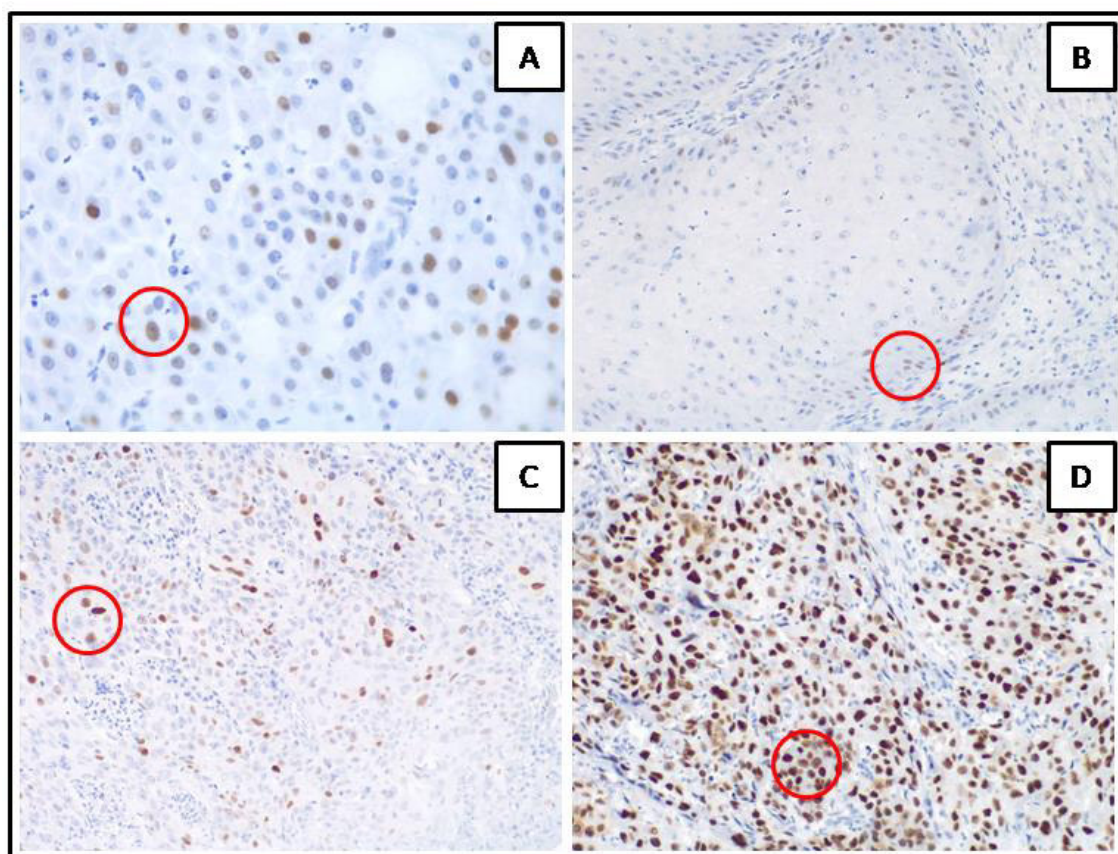


Figura 14. Expressão da proteína supressora tumoral p53 por imuno-histoquímica em cortes histológicos. Em vermelho destacou-se área representativa do índice de positividade para este marcador. (A) Tumor submandibular utilizado como controle positivo; (B) Carcinoma epidermóide peniano negativo para p53 (< 20%); (C) Carcinoma epidermóide peniano exibindo positividade (+) para p53 (20-50%); (D) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação positiva (++) para p53 (>50%).

O perfil clínico-histopatológico dos casos de acordo com o perfil de expressão de p53 está descrito na tabela 11. Quando avaliados os subtipos histológicos relacionados ao HPV vs. não relacionados, observamos 78,1% dos tumores negativos para p53 eram relacionados ao HPV ($p=0,002$) e 80% dos tumores condilomatosos puros também exibiam negatividade para p53 ($p=0,03$). Em relação ao grau de diferenciação tumoral, todos os tumores positivos (++) eram pouco diferenciados ou indiferenciados ($p=0,007$). Além disso, no grupo p53 positivo (+), foram mais frequentes tumores pT3 ($p=0,02$). Quando comparamos a expressão de p53 com a presença de coilócitos, foi observado que tumores com coilocitose em sua maioria exibiam negatividade para p53 ($p=0,04$).

Quando realizada a análise de sobrevida livre da doença pela curva de Kaplan-Meier, houve diferença no tempo de sobrevida entre os pacientes com tumores positivos e negativos para p53 (log-rank $p=0,01$) (Figura 15). A sobrevida livre de doença em pacientes positivos para p53 foi em geral baixa (19 meses) quando comparada a dos pacientes negativos (34 meses). Quando comparamos somente os tumores condilomatosos positivos e negativos para p53 (Figura 16), a positividade para p53 esteve associada a menor sobrevida livre de doença (log-rank $p=0,001$).

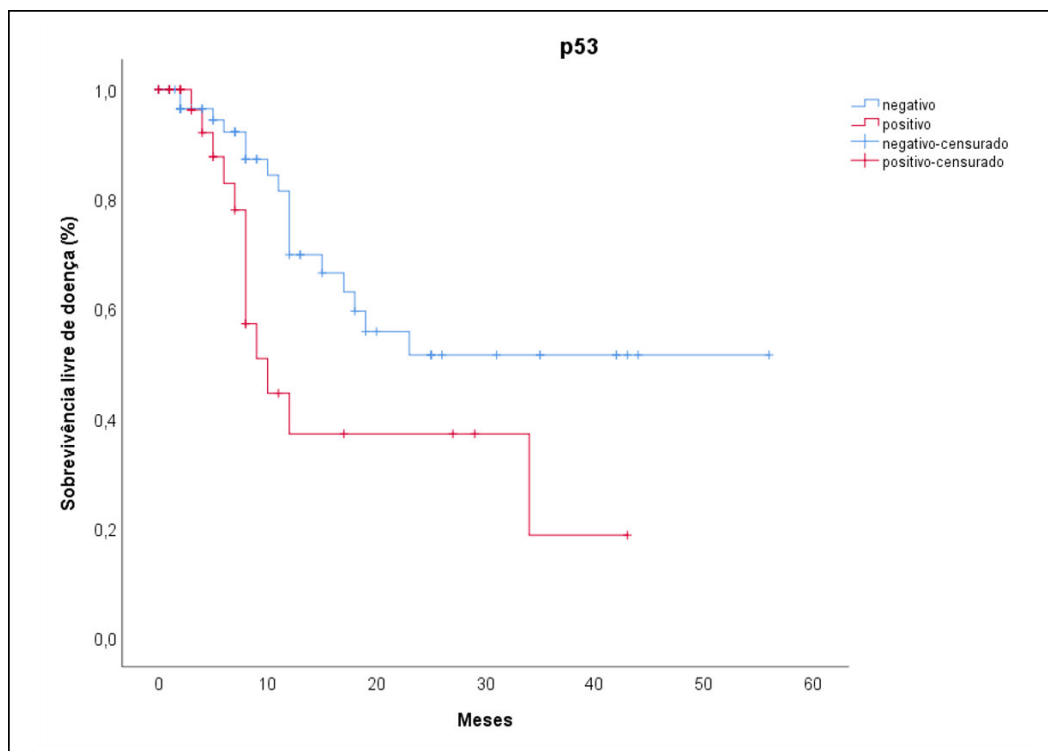


Figura 15. Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes de acordo com a positividade para p53 (log-rank $p=0,01$).

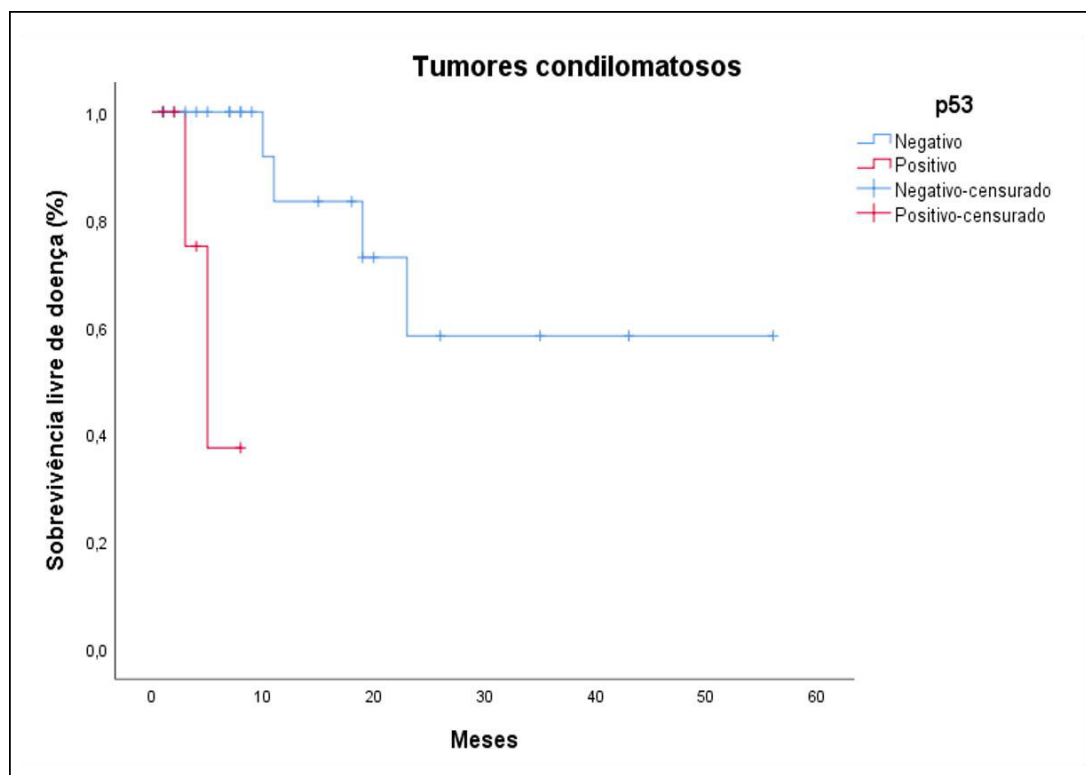


Figura 16. Análise de sobrevida livre da doença dos pacientes com tumores condilomatosos de acordo com o perfil de p53 (log-rank $p=0,001$).

Tabela 11. Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com a expressão de p53.

Variável	P53 (n=100)			P valor
	Negativo (n=64)	Positivo (20-50%) (n=27)	Positivo (>50%) (n=9)	
Idade	N (%)	N (%)	N (%)	
20-40 anos	10 (15,6)	6 (22,2)	2 (22,2)	p=0,83
40-60 anos	17 (26,6)	8 (29,6)	3 (33,3)	
> 60 anos	37 (57,8)	13 (48,1)	4 (44,4)	
Tipo de cirurgia				
Penectomia parcial	43 (67,2)	21 (77,8)	5 (55,6)	p=0,45
Penectomia total	16 (25,0)	5 (18,5)	2 (22,2)	
Emasculação	5 (7,8)	1 (3,7)	2 (22,2)	
Topografia				
Glande	26 (40,6)	10 (37,0)	2 (22,2)	p=0,59
Glande e corpo	37 (57,8)	16 (59,3)	7 (77,8)	
Outros	1 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	
ND	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	
Tamanho da lesão (cm)				
0,5 – 2,0	3 (4,7)	3 (4,7)	1 (11,1)	p=0,45
2,1-5,0	34 (53,1)	34 (53,1)	5 (55,6)	
5,1-10,0 / > 10,0	26 (40,6)	26 (40,6)	3 (33,3)	
ND	1 (1,6)	1 (1,6)	0 (0,0)	
Característica da lesão				

Ulcerada	19 (29,7)	6 (22,2)	2 (22,2)	p=0,46
Vegetante e/ou Verrucosa	24 (37,5)	12 (44,5)	2 (22,2)	
Ulcero-vegetante	14 (21,9)	5 (18,5)	5 (55,6)	
Outros	7 (10,9)	4 (14,8)	0 (0,0)	
Subtipo histológico				
Relacionados ao HPV	50 (78,1)	16 (59,3)	2 (22,2)	p=0,002
Não relacionados ao HPV	14 (21,9)	11 (40,7)	7 (77,8)	
Grau de diferenciação				
(G1) Bem diferenciado	11 (17,2)	3 (11,1)	0 (0,0)	p=0,007
(G2) Moderadamente diferenciado	25 (39,1)	8 (29,6)	0 (0,0)	
(G3) Pouco diferenciado	25 (39,1)	11 (40,7)	7 (77,8)	
(G4) Indiferenciado	1 (1,6)	5 (18,5)	2 (22,2)	
ND	2 (3,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Invasão angiolinfática				
Presente	17 (26,6)	6 (22,2)	2 (22,2)	p=0,66
Ausente	46 (71,9)	19 (70,4)	7 (77,8)	
ND	1 (1,6)	2 (7,4)	0 (0,0)	
Invasão perineural				
Presente	21 (32,8)	11 (40,7)	5 (55,6)	p=0,50
Ausente	42 (65,6)	15 (55,6)	4 (44,4)	
ND	1 (1,6)	1 (3,7)	0 (0,0)	
Tumor primário				
pT1a	8 (12,5)	2 (7,4)	0 (0,0)	p=0,02

pT2	17 (26,6)	3 (11,1)	5 (55,6)	
pT3	34 (53,1)	20 (74,1)	2 (22,2)	
pT4	2 (3,1)	0 (0,0)	2 (22,2)	
ND	3 (4,7)	2 (7,4)	0 (0,0)	
Estadiamento				
I	8 (12,5)	2 (7,4)	0 (0,0)	p=0,80
II	47 (73,4)	21 (77,8)	7 (77,8)	
III-IV	6 (9,4)	2 (7,4)	2 (22,2)	
ND	3 (4,7)	2 (7,4)	0 (0,0)	
Metástase linfonodal				
Presente	13 (20,3)	10 (37,0)	0 (0,0)	p=0,15
Ausente	12 (18,8)	4 (14,8)	5 (55,6)	
Sem linfadenectomia	39 (60,9)	13 (48,1)	4 (44,4)	
Extensão extranodal				
Presente	10 (15,6)	8 (29,6)	5 (55,6)	p=0,06
Ausente	15 (23,4)	6 (22,2)	0 (0,0)	
Sem linfadenectomia	39 (60,9)	13 (48,1)	4 (44,4)	

(N) frequência absoluta; (%) frequência relativa; (p valor) Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado

4.6 Expressão proteica de ki67

A análise de expressão proteica de ki67 por imuno-histoquímica foi conduzida de acordo com os critérios propostos por Berdjis et al. (2005). Dessa forma, foram classificados em positividade baixa e alta. Os casos com padrão de imunomarcacão < 40,5% foram considerados com baixa expressão, e os casos com >40,5% foram classificados como de alta expressão. Esta análise foi realizada de forma global (Figura 17), analisando toda a extensão tumoral da lâmina (expressão geral), e em pontos com maior número de células em proliferação (*hotspot*) (Figura 18).

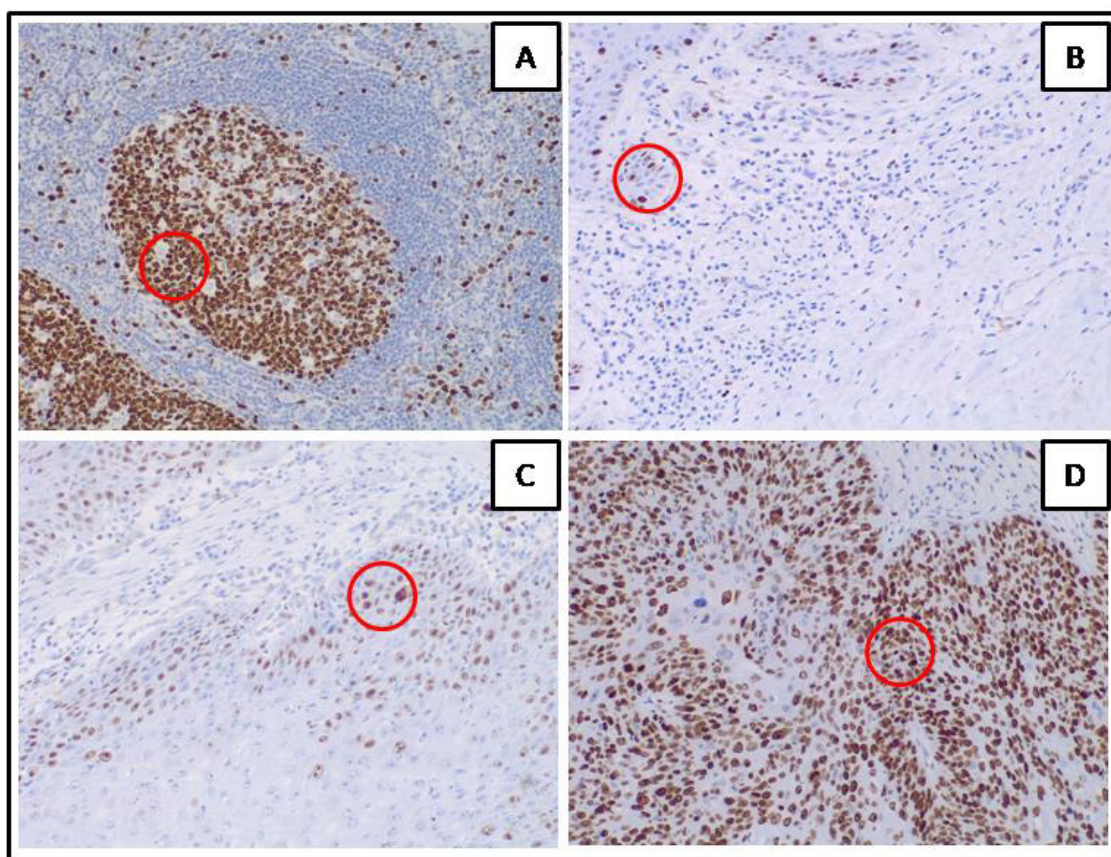


Figura 17. Expressão geral do marcador de proliferação celular (ki67) por imuno-histoquímica em cortes histológicos. Em vermelho destacou-se área representativa do índice de positividade para este marcador. (A) Tecido linfóide utilizado como controle positivo; (B) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação geral de 10% para ki67; (C) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação geral baixa (< 40,5%) para ki67 de acordo com os critérios de Berdjis et al. (2005); (D) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação alta (>40,5%) para ki67 de acordo com os critérios de Berdjis et al. (2005).

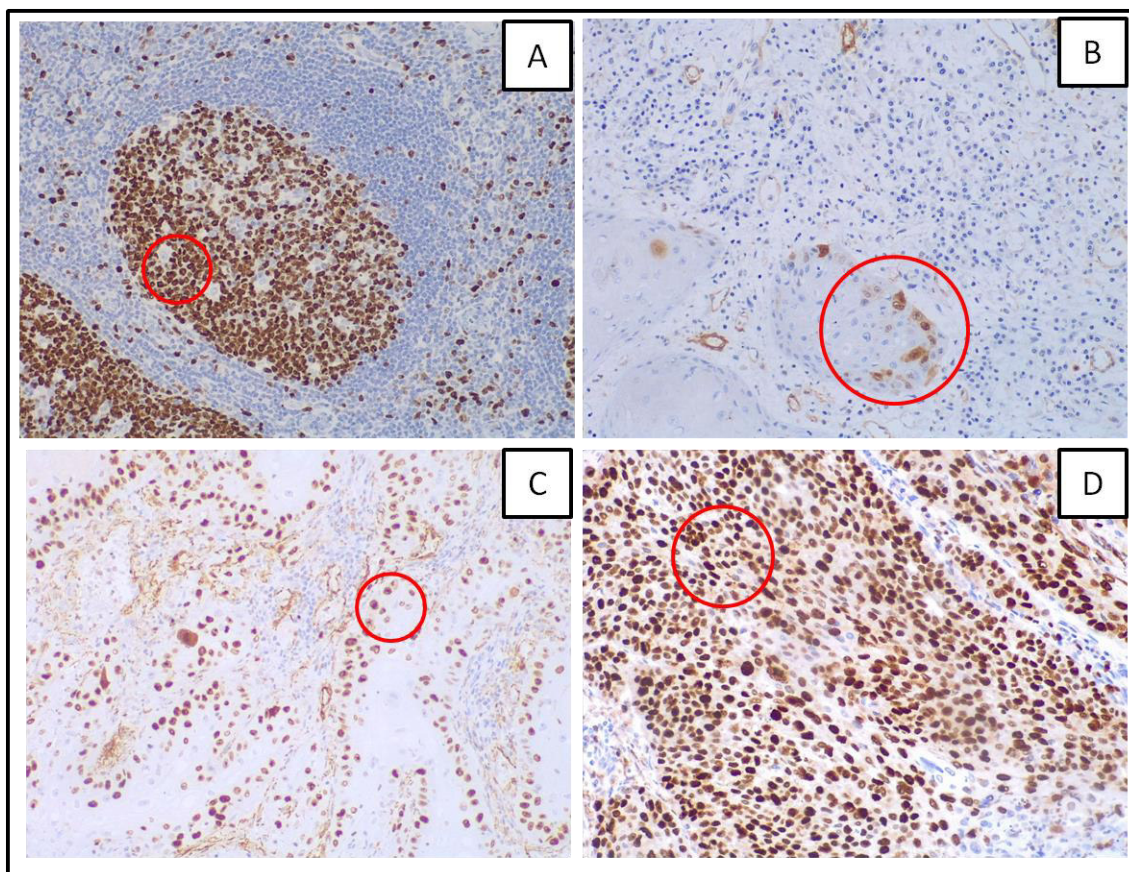


Figura 18. Expressão em *hotspot* do marcador de proliferação celular (ki67) por imuno-histoquímica em cortes histológicos. Em vermelho destacou-se área representativa do índice de positividade em zona *hotspot* (A) Tecido linfóide utilizado como controle positivo; (B) Carcinoma epidermóide peniano exibindo pouca marcação de 10% para ki67 em *hotspot*; (C) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação baixa em *hotspot* (< 40,5%) de acordo com os critérios de Berdjis et al. (2005); (D) Carcinoma epidermóide peniano exibindo marcação alta em *hotspot* (>40,5%) para ki67 de acordo com os critérios de Berdjis et al. (2005).

De acordo com o método adotado, 71% dos casos tiveram baixa expressão de ki67 na análise geral, e 29% tiveram alta expressão (Tabela 12). Quando analisado as zonas de *hotspot*, 42% dos casos tiveram baixa expressão de ki67 e 58% tiveram alta expressão. O perfil clínico-histopatológico dos casos de acordo com a expressão de ki67 está descrito na Tabela 13.

Tabela 12. Distribuição de expressão proteica de ki67 nos tumores avaliados (n=100).

Marcador	Padrão de expressão	N	%
Ki67 (geral)	Baixo	71	71
	Alto	29	29
Total		100	100
Ki67 (hotspot)	Baixo	42	42
	Alto	58	58
Total		100	100

(N) frequência absoluta; (%) frequência relativa

O padrão de expressão de ki67 geral e em *hotspot* na análise estatística demonstrou estar associado a diversas características histopatológicas. Tumores com coilocitose (76,2%) apresentaram baixa expressão de ki67 ($p=0,008$), sendo o mesmo observado no *hotspot* (72,7%), porém, sem associação estatística significativa ($p=0,08$). Os tumores com tamanho entre 0,5-2,0 cm todos possuíam baixa expressão geral de ki67 ($p=0,04$). Quando analisados os subtipos histológicos quanto ao perfil de expressão de ki67, foi observado que todos os tumores basalóides possuíam alta expressão geral ($p=0,003$) e em *hotspot* ($p=0,002$), e os tumores mistos que possuíam componente basalóide frequentemente também possuíam alta expressão geral ($p=0,03$) e em *hotspot* de ki67 ($p=0,006$). Os tumores condilomatosos frequentemente possuíam baixa expressão ki67, tanto geral ($p=0,03$) quanto no *hotspot* ($p=0,002$). Os tumores bem diferenciados possuíam menor expressão geral de ki67 ($p=0,009$), enquanto que os pouco diferenciados possuíam maior expressão em *hotspot* ($p=0,001$). Além disso, 78,9% dos tumores com ausência de invasão angiolinfática possuíam baixa expressão geral de ki67 ($p=0,03$), e com exceção de um caso, todos os tumores com metástase linfonodal apresentaram alta expressão geral de ki67 ($p=0,006$). Quando avaliada a presença de extensão extranodal, apenas dois casos não possuíam alta expressão de ki67 ($p=0,002$). Quando realizada análise por regressão logística binária, a positividade para ki67 (variável independente) também esteve associada à metástase linfonodal (variável dependente) ($p=0,018$ / OR 20,407 / IC 1,1692 – 246,100).

Quando comparados os dados de p16, p53, coilocitose e HPV com os dados de ki67, foi observado que a maioria dos casos p53 positivos (++) exibiam alta expressão geral de ki67 ($p=0,05$) e todos exibiam alta expressão em *hotspot* ($p=0,006$). Além disso,

foi observado que os casos p16 positivos (67,2%) exibiam alta expressão de ki67 em *hotspot* ($p=0,04$).

Na curva de Kaplan-Meier, os casos com baixa expressão de ki67 tiveram maior sobrevida livre da doença em comparação aos com alta expressão. Esse padrão foi observado tanto na análise geral (Figura 19) quanto no *hotspot* (Figura 20), no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos quanto realizado o teste log-rank (geral: $p=0,19$; *hotspot*: $p=0,31$).

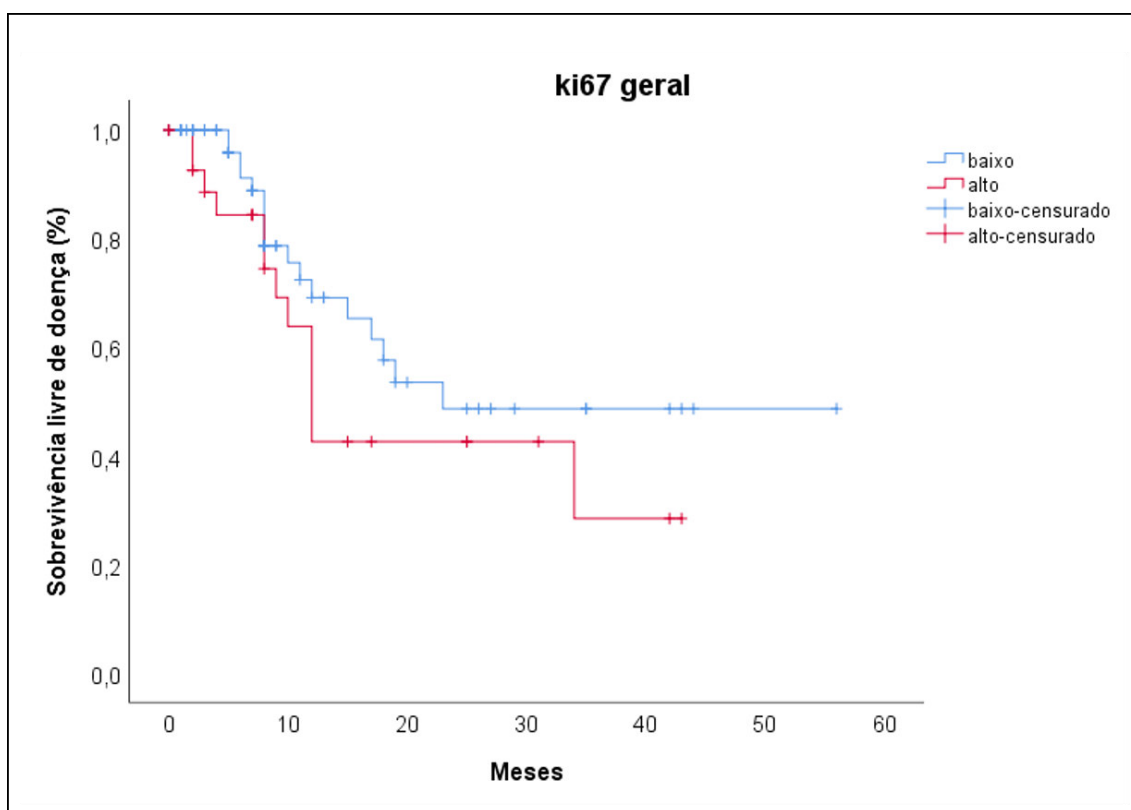


Figura 19. Análise de sobrevida livre da doença de acordo com o perfil de geral de expressão de ki67 (log-rank $p=0,19$).

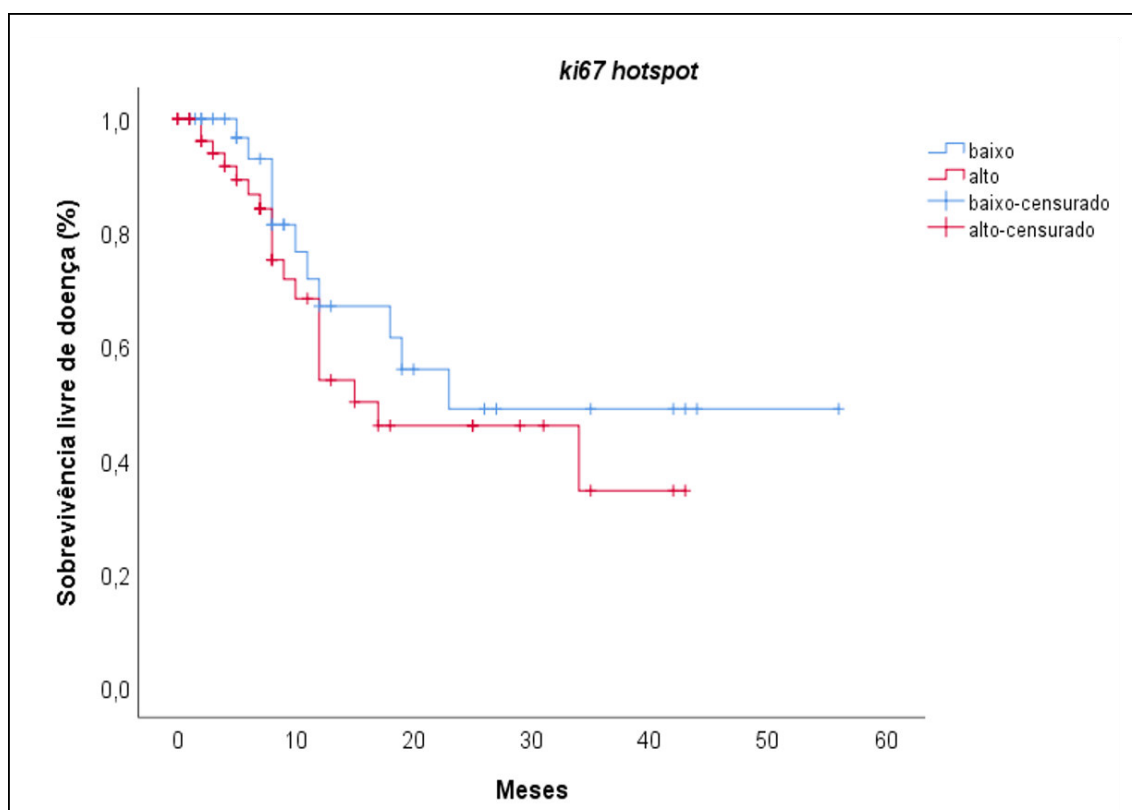


Figura 20. Análise de sobrevida livre da doença de acordo com o perfil de expressão de ki67 em *hotspot* (log-rank $p=0,31$).

Tabela 13. Perfil clínico-histopatológico dos tumores de acordo com a expressão de ki67.

Variável	Ki67					
	Geral (n=100)		P valor	Hotspot (n=100)		P valor
	Baixo (n=71)	Alto (n=29)		Baixo (n=42)	Alto (n=58)	
Idade	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
20-40 anos	12 (16,9)	6 (20,7)	p=0,49	4 (9,5)	14 (24,1)	p=0,07
40-60 anos	18 (25,4)	10 (34,5)		10 (23,8)	18 (31,0)	
> 60 anos	41 (57,7)	13 (44,8)		28 (66,7)	26 (44,8)	
Tipo de cirurgia						
Penectomia parcial	48 (67,6)	21 (72,4)	p=0,93	31 (73,8)	38 (65,5)	p=0,60
Penectomia total	17 (23,9)	6 (20,7)		9 (21,4)	14 (24,1)	
Emasculação	6 (8,5)	2 (6,9)		2 (4,8)	6 (10,3)	
Topografia						
Glande	28 (39,4)	10 (34,5)	p=0,50	20 (47,6)	18 (31,0)	p=0,08
Glande e corpo	42 (59,2)	18 (62,1)		21 (50,0)	39 (67,2)	
Outros	1 (1,4)	0 (0,0)		1 (2,4)	(0,0)	
ND				0 (0,0)	1 (1,7)	
Tamanho da lesão (cm)						
0,5 – 2,0	7 (9,9)	0 (0,0)	p=0,04	2 (4,8)	5 (8,7)	p=0,67
2,1-5,0	38 (53,5)	18 (62,1)		25 (59,5)	31 (53,4)	
5,1-10,0 / > 10,0	26 (36,6)	9 (31,0)		15 (35,7)	20 (34,5)	
ND	0 (0,0)	2 (6,9)		0 (0,0)	2 (3,4)	

Característica da lesão						
Ulcerada	20 (28,2)	7 (24,1)	p=0,45	12 (28,6)	15 (25,9)	p=0,06
Vegetante e/ou Verrucosa	28 (39,4)	10 (34,5)		21 (50,0)	17 (29,3)	
Úlcero-vegetante	14 (19,7)	10 (34,5)		5 (11,9)	19 (32,8)	
Outros	9 (12,7)	2 (6,9)		4 (9,5)	7 (12,1)	
Subtipo histológico						
Relacionados ao HPV	49 (69,0)	19 (65,5)	p=0,81	30 (71,4)	38 (65,5)	p=0,66
Não relacionados ao HPV	22 (31,0)	10 (34,5)		12 (28,6)	20 (34,5)	
Grau de diferenciação						
(G1) Bem diferenciado	14 (19,7)	0 (0,0)	p=0,009	12 (28,6)	2 (3,4)	p=0,001
(G2) Moderadamente diferenciado	26 (36,6)	7 (24,1)		18 (42,9)	15 (25,9)	
(G3) Pouco diferenciado	25 (35,2)	18 (62,1)		9 (21,4)	34 (58,6)	
(G4) Indiferenciado	5 (7,0)	3 (10,3)		2 (4,8)	6 (10,3)	
ND	1 (1,4)	1 (3,4)		1 (2,4)	1 (1,7)	
Invasão angiolinfática						
Presente	14 (19,7)	11 (37,9)	p=0,03	9 (21,4)	16 (27,6)	p=0,77
Ausente	56 (78,9)	16 (55,2)		32 (76,2)	40 (69,0)	
ND	1 (1,4)	2 (6,9)		1 (2,4)	2 (3,4)	
Invasão perineural						
Presente	23 (32,4)	14 (48,3)	p=0,20	11 (26,2)	26 (44,8)	p=0,05
Ausente	47 (66,2)	14 (48,3)		31 (73,8)	30 (51,7)	
ND	1 (1,4)	1 (3,4)		0 (0,0)	2 (3,4)	
Tumor primário						

pT1a	8 (11,4)	2 (6,9)	p=0,45	7 (16,7)	3 (5,2)	p=0,10
pT2	14 (19,7)	11 (37,9)		8 (19,0)	17 (29,3)	
pT3	42 (59,2)	14 (48,3)		24 (57,1)	32 (55,2)	
pT4	3 (4,2)	1 (3,4)		0 (0,0)	4 (6,9)	
ND	4 (5,6)	1 (3,4)		3 (7,1)	2 (3,4)	
Estadiamento						
I	8 (11,3)	2 (6,9)	p=0,77	7 (16,7)	3 (5,2)	p=0,03
II	53 (74,6)	22 (75,9)		31 (73,8)	44 (75,9)	
III-IV	6 (8,5)	4 (13,8)		1 (2,4)	9 (15,5)	
ND	4 (5,6)	1 (3,4)		3 (7,1)	2 (3,4)	
Metástase linfonodal						
Presente	14 (19,7)	14 (48,3)	p=0,006	6 (14,3)	22 (37,9)	p=0,002
Ausente	15 (21,1)	1 (3,4)		12 (28,6)	4 (6,9)	
Sem linfadenectomia	42 (59,2)	14 (48,3)		24 (57,1)	32 (55,2)	
Extensão extranodal						
Presente	10 (14,1)	13 (44,8)	p=0,002	5 (11,9)	18 (31,0)	p=0,02
Ausente	19 (26,8)	2 (6,9)		13 (31,0)	8 (13,8)	
Sem linfadenectomia	42 (59,2)	14 (48,3)		24 (57,1)	32 (55,2)	

(N) frequência absoluta; (%) frequência relativa; (p valor) Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

4.7 Estado físico genômico HPV 16

A análise do estado físico genômico do papilomavírus humano (HPV) foi realizada em 11 amostras positivadas para HPV. Em todos os tumores avaliados foi observado integração do genoma viral ao genoma celular. Em nove casos (81,9%) foi observado somente a forma integrada e em dois casos (18,1%) foi observado a forma integrada e epissomal (misto). Em seis amostras (54,5%) foi observado repetição de um mesmo padrão de integração, com conservação das regiões E1 e E7. O padrão de integração das onze amostras analisadas estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14. Perfil de integração genômica do papilomavírus humano (HPV) 16 em tumores de pênis.

AMOSTRA	SUBTIPO HPV	ESTADO FÍSICO	REGIÃO INTEGRADA
001	16	Integrado	E1, E7
002	16	Integrado	E1, E7
003	16	Integrado	E1, E7
004	16	Integrado	E1, E7
005	16	Misto	E1, E4, E5, L1, L2, E6, E7
006	16	Integrado	E6, E7, L1, L2
007	16	Integrado	E1, E7
008	16	Misto	E1, E4, E5, L1, L2, E6, E7
009	16	Integrado	E1, E5, L2, L1, E6, E7
010	16	Integrado	E6, E7, L1, L2
011	16	Integrado	E1, E7

Esses tumores em sua maioria eram usuais (45,4%), moderadamente diferenciados (54,5%), pT2-pT3 (63,6%), em estágio II (54,4%), sem invasão angiolinfática (54,4%) e com invasão perineural (54,4%). Entre os casos que realizaram linfadenectomia, todos apresentaram metástase linfonodal com extensão extranodal.

5 DISCUSSÃO

O câncer de pênis (CaPe) é uma doença negligenciada, agressiva e com grande impacto social e psicológico em seus acometidos (TORBRAND et al., 2016). A incidência desse tipo de tumor é alta em países em desenvolvimento como o Brasil, onde a incidência da doença é considerada a maior do mundo (COELHO et al., 2018).

Neste estudo foram avaliados 100 casos de tumores de pênis quanto às suas características clínico-histopatológicas, perfil de infecção pelo papilomavírus humano (HPV), expressão proteica de p16, p53 e ki67. O perfil sociodemográfico desses pacientes assemelha-se ao observado em outros estudos realizados no Brasil e no mundo. A maioria dos pacientes apresentava idade acima dos 60 anos, com média de 60,1 anos, corroborando com a prevalência desse tipo de tumor em homens acima dos 60 anos de idade (FAVORITO et al., 2008; FONSECA et al., 2010; DE SOUSA et al., 2015; MARTINS et al., 2018). Apesar disso, a ocorrência de CaPe não se limita a faixa etária citada, podendo também ser observado em indivíduos mais jovens (FAVORITO et al., 2008; KOIFMAN et al., 2011). No presente estudo, 47% dos casos possuíam idade inferior a 60 anos, e 19% possuíam idade entre 26 e 40 anos.

Houve prevalência de pacientes com baixa escolaridade (50% dos casos) e em sua maioria lavradores (58%), reforçando os achados sobre a prevalência de CaPe em indivíduos com vulnerabilidade socioeconômica (POW-SANG et al., 2010; CHAUX et al., 2011). Em um estudo realizado por Abdala e colaboradores (2017), foi observado que o conhecimento acerca do CaPe e seus fatores de risco é baixo, mesmo em indivíduos escolaridade alta.

Em relação aos fatores de risco, de 64 pacientes avaliados quanto ao tabagismo, 33 (51,5%) eram tabagistas. O tabagismo tem sido associado a um maior risco de desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias, dentre estas, tumores de pênis (DALING et al. 2005; KOIFMAN et al., 2011; COUTO et al., 2014). Um estudo realizado no Rio de Janeiro por Koifman e colaboradores (2011) descreveu que cerca de 56,5% eram fumantes. Além disso, a relação entre etilismo e desenvolvimento de CaPe também já foi descrita (MCINTYRE et al., 2011; GAO et al., 2016), sendo que, no presente estudo, de 49 pacientes avaliados quanto ao consumo de álcool, 26 eram etilistas.

A presença de fimose foi frequente nos pacientes avaliados quanto a esta variável (n=56), sendo observada em 62,5% dos casos (n=35). A associação entre fimose e CaPe foi feita pela primeira vez por Wolbarst (1932), quando avaliou 1.103 casos de CaPe nos Estados Unidos, dos quais nenhum paciente era Judeu, apesar de 3% da população do país ser judaica. A incidência de CaPe entre os Judeus é baixa, fato associado principalmente a prática de circuncisão neonatal nessa população, revelando um caráter preventivo dessa prática em relação ao desenvolvimento de CaPe. A maioria dos pacientes nos estudos com CaPe são descritos com essa condição anatômica (fimose), que parece aumentar 3,2 vezes as chances de desenvolvimento do tumor (PAULA et al., 2005; ROMERO et al., 2013; MORIS et al., 2017).

Na análise histológica, todos os tumores foram classificados como carcinoma de células escamosas (CEC), o que geralmente é observado nos estudos (CHAUX & CUBILLA et al., 2012). No entanto, o padrão de distribuição dos subtipos histológico diferiu daquele observado nos trabalhos com CaPe. Em um estudo realizado por Cubilla e colaboradores (2001), de 61 tumores avaliados, 59% correspondiam ao subtipo usual e apenas 10% correspondiam a tumores condilomatosos, sendo esse mesmo perfil de distribuição observado em estudos posteriores (CHAUX et al., 2010; WANG et al., 2018). No presente trabalho, cerca de 30% dos tumores eram condilomatosos puros, e quando considerados os tumores mistos com componente condilomatosos, esse percentual sobe para (51%), o maior percentual de tumores desse subtipo já observada entre os trabalhos com CaPe. Em um trabalho realizado no Maranhão por Martins et al., (2018), também foi observada alta prevalência de tumores condilomatosos, compondo cerca de 29,1% dos casos, e com um alto percentual de tumores mistos (16,3%).

O sítio anatômico mais frequentemente afetado foi a glândula do pênis (42%) dos casos, e quando avaliados de forma conjunta a glândula e corpo do pênis, representam 96% dos casos. Esses dados vão de encontro ao observado em estudo na área, onde a glândula do pênis tem sido descrita como o principal sítio de origem de lesões malignas no pênis (CHAUX et al., 2001; FAVORITO et al., 2008). Essas lesões possuíam tamanho principalmente entre 2,1-5,0 cm, com alto nível de infiltração tecidual (pT3-56%), estágio IIb (51%) e pouco diferenciados (43%). O grau de diferenciação é frequentemente utilizado como preditivo para o prognóstico, principalmente para metástase linfonodal (AITA et al., 2016). Tumores com grau histológico G3 ou G4, são geralmente mais agressivos que tumores grau I ou II (NAM et al., 2017). O comprometimento de vasos linfáticos e/ou sanguíneos foi

observado em 25% dos casos, e o comprometimento perineural foi observado em 36% dos tumores. Estes fatores estão diretamente relacionados a um pior prognóstico e sobrevida diminuída. (COELHO et al., (2018).

Além da invasão angiolinfática e perineural, os fatores prognósticos mais associados à sobrevida dos pacientes são a presença de metástase linfonodal e o extravasamento dos linfonodos comprometidos (extensão extranodal) (LEONE et al., 2017). No presente estudo, de 63 pacientes avaliados quanto a presença de linfonodomegalias, 40 (63,5%) apresentaram adenopatia inguinal na avaliação clínica. A presença de linfonodos palpáveis justifica a realização de linfadenectomia profilática devido a possibilidade de presença de micrometástase, principalmente em tumores pouco diferenciados, apesar de em 30 a 86% dos casos estar associada à alta morbidade e condições adversas (GUIMARÃES et al., 2011; O'BRIEN et al., 2017). No presente estudo, 44 pacientes realizaram linfadenectomia uni ou bilateral, dos quais na análise histológica 63,6% (n=28) apresentaram metástase linfonodal, sendo a grande maioria (82,1%) com extensão extranodal. A presença de extensão extranodal é em geral, e entre os pacientes com linfonodos comprometidos, característica de pior prognóstico (DE PAULA et al., 2005; CHIPOLLINI et al., 2017).

Em relação a presença de infecção pelo papilomavírus humano (HPV), neste trabalho a detecção molecular do vírus por PCR revelou alta prevalência de tumores infectados (67,1%). No estado do Maranhão, a maior prevalência de HPV em tumores penianos já descrita foi de 89,1% de positividade em trabalho realizado Martins et al., (2018). Essa diferença na prevalência encontrada pode estar associada ao viés amostral dos estudos, onde no trabalho de Martins et al. (2018) foram utilizadas amostras de tecido fresco, enquanto no presente estudo, foram utilizadas amostras obtidas a partir de tecido fixado em parafina, sabidamente de menor qualidade para ensaios moleculares (WATANABE et al., 2017; MCDONAUGH et al., 2019). Entretanto, em um trabalho realizado no Maranhão, De-Sousa e colaboradores (2015) detectaram HPV em 63,1% dos casos avaliados a partir de DNA extraído de tecido emblocado em parafina, o que se aproxima ao observado neste trabalho.

A prevalência de HPV no Brasil em indivíduo sem manifestação clínica é de 30-75% (AFONSO et al., 2017), no entanto, não há dados de prevalência do vírus em homens sem lesões no Maranhão que sustentem a relação entre prevalência de HPV e incidência de CaPe na região, já que a incidência de CaPe parece acompanhar a prevalência de infecção pelo vírus em indivíduos saudáveis (GININDZA et al., 2017). Em um trabalho realizado por Freire

e colaboradores (2014), a prevalência de HPV em 366 homens sem lesões avaliados no Rio de Janeiro foi de 72,1%.

Quando comparamos os dados clínico-histopatológicos dos casos com os dados de detecção viral por PCR, não foi observada associações estatisticamente significantes. Na análise de sobrevida livre de doença (SLD), não houve diferença significativa entre o grupo positivo e negativo para HPV (log-rank $p=0,31$), no entanto, nesta casuística pacientes HPV positivos tiveram menor SLD quando comparados aos negativos. Em câncer orofaríngeo, pacientes com positividade para o vírus tendem a ter um aumento na sobrevida de até cinco anos em relação aos casos negativos, o mesmo já observado em pacientes com CaPe (ANG et al., 2010; KOERBER et al., 2014; FLAHERTY et al., 2014). Para conhecimento deste estudo, apenas um trabalho publicado por Gregoire et al., (1995) demonstrou associação do HPV como fatores de pior prognóstico em câncer de pênis, geralmente com tumores em alto estadiamento e com padrão de crescimento agressivo.

Na análise histológica, alterações citoarquiteturais compatíveis com infecção viral (coilocitos) foram identificadas em 88,4% dos casos avaliados (84/95). Em um trabalho realizado por Koifman e colaboradores (2011) em tumores de pênis, a prevalência de coilocitos foi de 53,9%, havendo alta especificidade (90%), mas baixa sensibilidade na detecção do HPV. No presente estudo, a presença de coilocitose foi associada a subtipos histológicos relacionados ao HPV ($p=0,03$) e maior tempo de sobrevida livre de doença (log-rank $p=0,006$). Corroborando com nossos achados, De-Paula e colaboradores (2007) observaram que a presença de coilocitos em CaPe esteve associada a tumores com baixo ou moderado estadiamento ($p=0,0005$) e melhor sobrevida livre de doença, sendo observada em 63,1% dos casos. Ademais, Ornellas e colaboradores (2008) observaram melhor SLD (log rank $p=0,001$) em pacientes com coilocitose, e maior risco de metástase linfonodal em pacientes com ausência de coilocitose ($p=0,0005$).

Quando avaliado o padrão de expressão de p16, 58% dos casos considerados como positivos. Quando comparamos o índice de positividade encontrado com o de outros estudos, apenas um trabalho publicado por Steinestel. e colaboradores (2015) relatou positividade de 58,6% dos casos, semelhante ao observado no presente estudo (58%). Quando comparada com os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados, a positividade para p16 demonstrou estar associada a tumores que acometiam a glândula e corpo do pênis ($p=0,01$) e subtipos histológicos relacionados a HPV ($p=0,05$). Ademais, houve associação estatística com tumores com componente basalóide ($p=0,02$), o mesmo observado por Martins et al. (2018)

e em outros trabalhos com CaPe (CUBILLA et al., 2011; STEINESTEL et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

A superexpressão de p16 é amplamente utilizada como marcador indireto de infecção por HPV de alto risco em diversos tipos de tumores associados ao vírus (ROMAGOSA et al., 2011; GEIBLER et al., 2013). No presente estudo houve associação entre a positividade para HPV por PCR e a positividade para p16 ($p=0,006$), revelando que possivelmente grande parte desses tumores são infectados por HPV de alto risco oncogênico. Cubilla e colaboradores (2011) também observaram forte associação entre positividade para HPV e superexpressão de p16. De-sousa e colaboradores (2015) observaram que grande parte dos CaPe HPV positivos no Maranhão carregavam genótipos de alto risco, principalmente o subtipo 16, sendo o mesmo observado por Martins e colaboradores (2018), onde 93,9% dos casos HPV positivos foram de alto risco.

A superexpressão de p16 e presença do genoma viral tem sido descritos como fatores de bom prognóstico em tumores associados a HPV, com melhor resposta terapêutica e maior sobrevida livre de doença (KUMAR et al., 2009; SAITO et al., 2016; ZHANG et al., 2018; MARTINS et al., 2018; SAND et al., 2019). No entanto, a superexpressão de p16 no presente estudo esteve associada a menor sobrevida livre de doença (log-rank $p=0,03$). Diante destes dados, realizamos análise de sobrevida considerando somente os casos que submetidos a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico vs. aqueles que realizaram somente tratamento cirúrgico, em ambas as situações, os casos p16 positivos possuíam menor SLD comparados aos negativos, porém sem significância estatística pelo teste de log-rank.

Quando avaliamos a sobrevida livre de doença somente no grupo positivo para HPV, os casos HPV positivo / p16 negativo tiveram melhor sobrevida livre de doença em comparação ao grupo HPV positivo / p16 positivo, o mesmo padrão foi observado quando avaliamos somente tumores condilomatosos positivos e negativos para p16, com pior sobrevida nos tumores positivos. A associação com menor sobrevida também foi mantida quando excluído os casos basalóides e com componentes basalóides.

Na análise de expressão da oncoproteína viral E6, 42% dos casos foram positivos. Quando comparado o perfil de expressão de E6 com os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados, a ausência de expressão de E6 foi associada à tumores bem diferenciados ($p=0,001$), ausência de invasão angiolinfática ($p=0,001$) e perineural

($p=0,001$), estadiamento I-II ($p=0,01$) e tumores condilomatosos ($p=0,005$). A positividade para E6 esteve associada a presença de metástase linfonodal ($p=0,001$) e extensão extranodal ($p=0,02$). Esta associação com metástase linfonodal foi mantida quando realizada análise por regressão logística binária ($p=0,037$ / OR 6,792 / IC 1,120 – 41,187). Além disso, a positividade para E6 esteve associada à menor SLD, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas pelo teste de log-rank ($p=0,17$).

No presente estudo, a expressão de E6 esteve associada a fatores de pior prognóstico como metástase linfonodal e extensão extracapsular. Para conhecimento desta pesquisa, não há trabalhos descrevendo o perfil de expressão desta proteína em tumores de pênis. Em câncer de colo do útero, Rongalia e colaboradores (2013) observaram positividade para E6 em 39,5% dos casos avaliados ($n=114$), havendo associação entre a positividade para E6 e p16 ($p=0,027$), o mesmo não foi observado no presente estudo. Em um trabalho realizado por De Boer e colaboradores (2007), foi observado que a superexpressão de mRNA das oncoproteínas E6/E7 em câncer de colo do útero esteve intrinsecamente associada a fatores de pior prognóstico ($p=0,006$) e sobrevida diminuída, sendo o mesmo observado em análise multivariada. No entanto, o mesmo não foi observado em relação a carga viral, sugerindo perfis prognósticos distintos mesmo em casos HPV positivos.

A associação entre superexpressão de E6 com metástase linfonodal pode ser explicada pelo mecanismo de ação viral na célula hospedeira. Geralmente, há inativação da proteína supressora tumoral p53 via E6, desregulando os mecanismos de divisão e estimulando a proliferação celular (HAUSSEN et al., 2002). O processo de invasão tumoral necessita de importantes transformações na interação entre epitélio e estroma, as quais são influenciadas pela presença do HPV (TANG et al., 2007). A superexpressão de E6 parece desempenhar papel regulatório na expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), permitindo que haja formação de vasos sanguíneos, contribuindo para o crescimento tumoral e aumento do potencial metastático (TOUSSAINT-SEMITH et al., 2004; CLERE et al., 2007), o que também corrobora com os achados do presente estudo, no qual a ausência de expressão de E6 esteve associada à casos sem invasão angiolinfática.

Frente às limitações na utilização de DNA extraído de tecido FFPE para ensaios moleculares, no presente estudo foi possível avaliar o estado físico do HPV em apenas 11 amostras, das quais todas possuíam integração do genoma viral no genoma hospedeiro, 2

casos em estado misto e 9 em estado integrado. Devido ao número de amostras avaliadas, não foi possível realizar análise estatística entre os parâmetros clínico-histopatológicos e o perfil de integração. O processo de integração viral é bem descrito em câncer de colo do útero e um importante marcador de progressão tumoral (ARIAS-PULIDO et al., 2006) e para conhecimento desta pesquisa, não há trabalhos descrevendo o perfil de integração viral em câncer de pênis.

Curiosamente, no presente trabalho, mesmo em um pequeno número de amostra, foi observado integração do genoma viral em todos os casos, e com um padrão frequente de conservação das regiões E1 e E7 (54,5%). Em câncer de colo do útero, o processo de integração parece ocorrer por ruptura da região E2, linearização do genoma viral e integração genômica em sítios frágeis do genoma hospedeiro, principalmente com integração das regiões de E6 e E7 (ZHAO et al., 2016; AKAGI et al., 2017). Esse padrão de integração de E6 e E7 em tumores de colo do útero difere do observado nas amostras de câncer de pênis avaliadas neste trabalho, sugerindo mecanismos distintos de desregulação e progressão tumoral entre esses dois tipos de tumores associados ao vírus. Além disso, a expressão de E7 em câncer de colo do útero parece modular a resposta a reposta à danos ao DNA, diminuindo a sensibilidade das células tumorais à radiação e promovendo resistência a esse tipo de tratamento (ELDAKHAKHNY et al., 2018). Curiosamente, tumores de pênis geralmente possuem radioresistência e os casos com boa resposta inicial possuem níveis significativos de recidiva local (POMPEO et al., 2010). Dessa forma, faz-se necessário o aumento no número de amostras para análise de integração viral, bem como a análise de expressão proteica de E7 para melhor compreensão deste mecanismo na casuística local.

Além da definição do estado físico do vírus, a descrição dos sítios de integração também é essencial para melhor compreensão dos mecanismos pelo qual a integração viral gera desregulação celular (MCBRIDE & WARBURTON, 2017). Em uma revisão sistemática, Bodelon e colaboradores (2016) analisaram mais de 1500 sítios de integração do HPV descritos na literatura e relataram maior frequência de integração em 10 citobandas (3q28, 8q24.21, 13q22.1, 2q22.3, 3p14.2, 8q24.22, 14q24.1, 17p11.1, 17q23.1 e 17q23.2), as quais frequentemente possuíam alterações no número de cópias de genes importantes para o controle do ciclo celular.

No presente estudo, marcadores atrelados à infecção por HPV foram associados a fatores de pior prognóstico (p16 e E6), diferindo do que se observa em outros tumores

associados ao vírus. No entanto, muitas perguntas continuam sem resposta em câncer de pênis, como por exemplo, o estado físico genômico do HPV, que tem sido pouco explorado nesses tumores e talvez possa contribuir para elucidação dos achados encontrados neste trabalho.

Um fato interessante seria a variação histológica e prognóstica observada em tumores associados ao HPV. Qual a explicação para tumores condilomatosos e basalóides (ambos associados a HPV) possuírem prognósticos totalmente distintos? Tumores condilomatosos geralmente possuem bom prognóstico, enquanto basalóides possuem pior prognóstico. A superexpressão de p16 está associada a tumores basalóides sendo utilizada como marcador diagnóstico para este subtipo e para presença de HPV de alto risco (CLARK et al., 2013). No presente estudo, tumores condilomatosos foram em sua maioria negativos para E6 ($p=0006$), sendo este subtipo considerado do ponto de vista histológico 100% atrelado a infecção pelo vírus. Quando avaliamos a sobrevida livre de doença em tumores condilomatosos p16 positivos e negativos, também observamos pior sobrevida em tumor p16 positivo. Com base nestes achados, é possível observar uma possível heterogeneidade na gênese e progressão de tumores de pênis mesmo em tumores HPV positivos.

No presente estudo, quando avaliamos simultaneamente a presença de coilocitose, positividade para p16, E6 e detecção molecular do HPV (PCR), todos os casos possuíam no mínimo positividade para uma variável, com exceção de um caso descrito como usual com diferenciação sarcomatosa, variante nova ainda não descrita em câncer de pênis (relato de caso em andamento). Curiosamente, quando comparados estudos de detecção de HPV em CaPe de outras localidades com os trabalhos realizados com pacientes do Maranhão, independentemente do método adotado (tecido fresco ou parafina), os paciente do Maranhão apresentam tumores com maior positividade para o vírus (DE-SOUSA et al., 2015; SCHEINER et al., 2008; MARTINS et al., 2018; YANG ZHAO et al., 2019). Os dados descritos por De-Sousa et al., (2015), Martins et al., (2018) e os descritos no presente estudo fornecem evidências que a casuística local possui um perfil distinto daquele observado em outras localidades, com alta ou total prevalência de tumores HPV positivo.

Quando avaliamos o perfil de expressão de p53, observamos que 64 casos foram negativos e 36 positivos (27 + / 9 ++). A análise das características histopatológicas com

base no perfil de p53 revelou que: a negatividade para p53 esteve associada a tumores relacionados ao HPV ($p=0,002$) e subtipo histológico condilomatoso ($p=0,03$). Além disso, a positividade para p53 esteve associada a tumores pouco ou indiferenciados ($p=0,007$) e tumores pT3 ($p=0,02$), sendo o mesmo observado por Marinescu e colaboradores (2016), onde todos os tumores indiferenciados foram positivos para p53. A presença de coilocitose esteve associada a negatividade para p53 no presente estudo ($p=0,04$), estes dados corroboram com a principal via descrita para ação do HPV sob a proteína p53 (AKAGI et al., 2017).

A análise de sobrevida revelou maior tempo de sobrevida livre da doença nos pacientes p53 negativos, onde a SLD foi em média 34 meses, destoando do observado nos casos positivos (19 meses). Quando consideramos somente os casos condilomatosos, houve menor sobrevida nos casos positivos para p53 quando comparados com os condilomatosos negativos. positividade para p53 tem sido atrelada a pior prognóstico em CaPe, com baixa SLD e maior risco de metástase linfonodal (GUNIA et al., 2012). Lopes e colaboradores (2012) em análise multivariada observaram que a expressão de p53 foi um fator independente para ocorrência de metástase linfonodal de CaPe, no entanto, não foi observada associação entre p53 e metástase linfonodal no presente estudo.

Na análise do índice de proliferação celular (ki67), foi observado que 29% dos casos tiveram alta expressão geral ($>40,5\%$) de ki67, e 58% tiveram alta expressão em *hotspot*. Quando avaliadas as características clínico-histopatológicas, todos os tumores basalóides puros possuíam alta expressão geral de ki67 ($p=0,003$) e em *hotspot* ($p=0,002$), o mesmo foi observado em tumores mistos com componente basalóide (geral: $p=0,03$ e *hotspot*: $p=0,002$). Este mesmo padrão foi observado por Stankiewicz e colaboradores (2012) em tumores de pênis, e ainda associação entre ki67 e infecção por HPV de alto risco ($p=0,0001$). Curiosamente, no presente estudo, a positividade para p16 esteve associada a alta expressão de ki67 em *hotspot* ($p=0,04$). Em neoplasias intraepiteliais do colo uterino, a alta expressão de ki67 parece ser um bom preditor de infecção por HPV de alto risco (MIMICA et al., 2010).

Tumores condilomatosos estiveram associados a baixa expressão de ki67 geral e em *hotspot*, o que evidencia o padrão de crescimento lento desses tumores, e sua associação com melhor prognóstico e rara ocorrência de metástase (PROTZEL et al., 2007). A alta expressão de ki67 também esteve associada a fatores de pior prognóstico nos tumores avaliados, sendo frequente em tumores mais indiferenciados ($p=0,001$), com invasão

angiolímfática ($p=0,03$) e perineural ($p=0,05$). Além disso, a alta expressão de ki67, tanto geral quanto em *hotspot*, esteve associada a metástase linfonodal (geral: $p=0,006$; *hotspot*: $p=0,002$) e extensão extracapsular (geral: $p=0,002$; *hotspot* $p=0,02$). Não houve diferença significativa nas curvas de sobrevida com base nos dados de ki67 geral e em *hotspot*.

A expressão de ki67 tem sido associada em tumores de cabeça e pescoço com aumento do índice proliferativo, desdiferenciação tumoral, comprometimento linfonodal e progressão da doença (LIU et al., 2003; XIE et al., 2016). Em CaPe alguns trabalhos tem demonstrado o mesmo valor preditivo de pior prognóstico e menor sobrevida livre de doença (BERJIS et al., 2005; PROTZEL et al., 2007; STANKIEWICZ et al., 2012). No presente estudo, a alta expressão de ki67 também foi associada a positividade para p53 ($p=0,006$), corroborando com o comportamento mais agressivo de tumores p53 positivos em comparação aos negativos.

O CaPe é uma doença negligenciada, heterogênea, agressiva e mortal quando não diagnosticada precocemente. Há alta incidência desse tipo de câncer no estado do Maranhão e pouco se conhece sobre o perfil etiológico local desses tumores. Os poucos trabalhos já realizados revelam certa discordância no que se observa em pacientes de outras localidades, com alta prevalência de tumores infectados pelo HPV e de padrões histológicos que sustentam os achados de detecção viral.

A maioria dos pacientes atendidos no Maranhão encontram-se em situação de vulnerabilidade socioeconômica, e grande parte são oriundos do interior do estado. Há somente dois centros de referência no tratamento da doença, ambos localizados na capital São Luís, o que dificulta o diagnóstico precoce e o monitoramento desses pacientes. Além disso, a ausência de protocolos clínicos específicos e efetivos para manejo desses pacientes torna o diagnóstico precoce decisivo na avaliação prognóstica, o que geralmente não ocorre.

Frente a estes fatores, pesquisas que visem compreender os aspectos etiológicos, evolução e progressão desses tumores são de suma importância para o estado. Neste estudo, foi possível avaliar o perfil clínico e histopatológico de 100 pacientes diagnosticados com CaPe no Maranhão, analisando fatores como infecção pelo papilomavírus humano (HPV), estado físico viral e padrão de expressão proteica. Foi observado uma alta prevalência de tumores associados ao HPV, tanto nas análises histológicas, moleculares e proteicas, com descrição de eventos de integração em onze

casos avaliados. Estes fatores reforçam a importância de programas de imunização voltados para a população masculina. Além disso, foi possível analisar o perfil de expressão de proteínas chaves no processo de desregulação celular e oncogênese, revelando associações importantes com fatores de pior prognóstico como subtipos histológicos mais agressivos, invasão perineural e angiolinfática e de valor preditivo para metástase linfonodal.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo obtivemos dados clínicos e histopatológicos importantes para caracterização do perfil epidemiológico de tumores de pênis no Maranhão. Reafirmamos a alta incidência infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em tumores de pênis e descrevemos pela primeira vez o perfil imuno-histoquímico dessas lesões na casuística local. Ademais, relatamos um perfil recorrente de integração do genoma viral ao genoma hospedeiro, não antes descrito em câncer de pênis. Os achados revelaram marcadores com potencial aplicabilidade no diagnóstico e prognóstico da doença.

7 REFERÊNCIAS

ABADI, M., GY, H., BURK, R. D., ROMNEY, S. L., KADISH, A. S. Stringent criteria for histological diagnosis of koilocytosis fail to eliminate overdiagnosis of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia grade 1. **Human Pathology**, n. 19, v. 1, p. 54-59, 1998.

AFONSO, L. A. et al. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and methylation status of p16ink4a in penile cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 9999, p. 1-7, 2017.

AITA, G. A. et al. Tumor histologic grade is the most important prognostic factor in patients with penile cancer and clinically negative lymph nodes not submitted to regional lymphadenectomy. **International braz j urol**, v. 42, n. 6, p. 1136-1143, 2016.

ALEMANY, L. et al. Role of human papillomavirus in penile carcinomas worldwide. **European urology**, v. 69, n. 5, p. 953-961, 2016.

ANG, K. K. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010.

BANSAL, A.; SINGH, M.P.; RAI, B. Human papillomavirus-associated cancers: a growing global problem. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 6, n. 2, p. 84-89, 2016.

BERDJIS, N. et al. Expression of ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. **BJU international**, v. 96, p. 146-48, 2005.

BLEEKER, M.C.G. et al. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol**, v. 27, p. 141-150, 2009.

BOCCARDO, E.; VILLA, L.L. Vírus e câncer. In: **Oncologia Molecular**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, p.123-132, 2004.

CAMUS, S. et al. Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. **Oncogene**, v. 26, n. 28, p. 4059-4070, 2007.

CARVALHO, N.S. et al. Associação entre HPV e Câncer Peniano: Revisão da Literatura. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v. 19, n. 2, p. 92-95, 2007.

CHAUX, A. et al. Metastatic tumors to the penis: a report of 17 cases and review of the literature. **International journal of surgical pathology**, v. 19, n. 5, p. 597-606, 2011.

CHAUX, A. et al. Papillary squamous cell carcinoma, not otherwise specified (NOS) of the penis: clinicopathologic features, differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **The American journal of surgical pathology**, v. 34, n. 2, p. 223-230, 2010.

CHAUX, A. et al. Autopsy findings in 14 patients with penile squamous cell carcinoma. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 19, n. 2, p. 164–169, 2011.

CHAUX, A.; CUBILLA, A. L. Advances in the pathology of penile carcinomas. **Human pathology**, v. 43, n. 6, p. 771-789, 2012.

CHIPOLLINI, J. et al. Patterns of Regional Lymphadenectomy for Clinically Node-negative Patients with Penile Carcinoma: Analysis from the National Cancer Database From 1998 to 2012. **Clinical Genitourinary Cancer**, p. 1, 2017.

CHRISTOULIDOU, M.; SAHDEV, V.; HOUSSEIN, S.; MUNEER, A. Epidemiology of penile cancer. **Current Problem Cancer**, v.39, n. 3, p.129-136, 2015.

COELHO, R.W.P. et al. Penile Cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urology**, v. 18, n. 50, p. 2-7, 2018.

COSTA, S. et al. Câncer de pênis: epidemiologia e estratégias de prevenção. **Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde Facipe**, v. 1, n. 2, p.23-33, 2013.

COUTO, T. C. et al. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **International braz j urol**, v. 40, n. 6, p. 738-744, 2014.

CUBILLA, A. L. et al. Value of p16(INK)⁴(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases. **Am J Surg Pathol**, n. 2, v. 35, p.253-61, 2011.

CUBILLA, A. L. et al. Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of verruciform' penile tumors. **The American journal of surgical pathology**, v. 24, n. 4, p. 505-512, 2000.

CLERE, N. et al. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 15, p. 3239–3250, 2007.

DALING, J. R. et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. **International Journal of Cancer**, v. 116, n. 4, p. 606-616, 2005.

DE BOER, M. A. et al. High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 132–138, 2007.

DE PAULA, A.A.P. et al. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 243-252, 2005.

DE SOUSA, I. D. B. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. **BMC urology**, v. 15, n. 1, p. 13, 2015.

DONG, L. et al. Changes in genotype prevalence of human papillomavirus over 10-year follow-up of a cervical cancer screening cohort. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 38, n. 1, p. 20-25, 2017.

ESCANDE, A. et al. Brachytherapy for Conservative Treatment of Invasive Penile Carcinoma: Prognostic Factors and Long-Term Analysis of Outcome. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 98, 2017.

FAVORITO, L.A.; NARDI, A.C. et al. Epidemiologic Study on Penile Cancer in Brazil. **Brazilian Society of Urology**, v. 34, n. 5, p. 587-593, 2008.

FLAHERTY, A. et al. Implications for human papillomavirus in penile cancer. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, v.32(1), p. 53-58, 2014.

FLORIN, L. et al. Assembly and translocation of papilloma virus capsid proteins. **Journal of virology**, v. 76, n. 19, p. 10009-10014, 2002.

FONSECA, A.G. et al. Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amz Saude**, v. 1, n. 7, p. 85-90, 2010.

GAO, G.; SMITH, D. I. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 150, n. 3-4, p. 185-193, 2016.

GEIBLER, C. et al. The role of p16 expression as a predictive marker in HPV-positive oral SCCN--a retrospective single-center study. **Anticancer Res**, n.3, v. 33, p. 913-16, 2013.

GININDZA, T. G. et al. Prevalence of and associated risk factors for high risk human papillomavirus among sexually active women, Swaziland. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170189, 2017.

GRAVITT, P. et al. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. **J Clin Microbiol**, n. 3, v. 40, p. 902-7, 2002.

GREGOIRE, L. et al. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, n. 22, v. 87, 1995.

GUIMARÃES, G. C. et al. Penile cancer: epidemiology and treatment. **Current oncology reports**, v. 13, n. 3, p. 231-239, 2011.

GUNIA, S. et al. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. **J Clin Pathol**, n. 3, v. 65, p. 232-36, 2012.

HANKEBERG, O.W. et al. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. **European Urology**, v. 67, n. 01, p. 142-150, 2015.

INCA. **HPV e câncer** - Perguntas mais frequentes. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes. Acesso em: 19 jun. de 2019.

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. **J Clin Microbiol**, n. 35, v. 3, p. 791-5, 1997.

KAYES, O. et al. Molecular and genetic pathways in penile cancer. **The Lancet. Oncology**, v. 8, n. 5, 2007.

KHATTAK, F. et al. Mathematical Modeling of E6-p53 interactions in Cervical Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 4, p. 1057, 2017.

KOERBER, S. A. et al. Influence of human papillomavirus and p16 INK4a on treatment outcome of patients with anal cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v.113, n.3, p.331-336, 2014.

KOIFMAN, L. et al. Epidemiological aspects of penile cancer in Rio de Janeiro: evaluation of 230 cases. **Int braz j urol**, v.37, n.2, p.231-243, 2011.

KRIEGSMANN, M. et al. Detection of HPV subtypes by mass spectrometry in FFPE tissue specimens: a reliable tool for routine diagnostics. **Journal of Clinical Pathology**, p. 204-217, 2016.

KUMAR, B. et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, Sex, and Smoking As Indicators of Response to Therapy and Survival in Oropharyngeal Cancer. **J Clin Oncol**, n. 19, v. 26, p. 3128-37, 2009.

LEBELO, R. L. et al. Diversity of HPV types in cancerous and pre-cancerous penile lesions of South African men: Implications for future HPV vaccination strategies. **Journal of medical virology**, v. 86, n. 2, p. 257-265, 2014.

LI, F. et al. Diagnosis and treatment of penile verrucous carcinoma. **Oncology letters**, v. 9, n. 4, p. 1687-1690, 2015.

LIU, Y. et al. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. **Oncotarget**, v.7, n. 5, p. 5852, 2016.

LOPES, A. et al. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy, **Journal of Urology**, n. 168, v. 1, p. 81-86, 2002.

MARINESCU, A. et al. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursor lesions. **Rom J Morphol Embryol**, n. 2, v. 57, p. 691-96, 2016.

MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017.

MARTINS, V.A. et al., P16^{INK4a} expression in patients with penile cancer. **Plos One**, v. 13, n. 10, p. 1-13, 2018.

MCBRIDE, A.A.; WARBURTON, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **Plos Pathogens**, p. 1-7, 2017.

MCDONOUGH, S.L. et al. Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. **Plos One**, n.4, v. 14, 2019.

MCINTYRE, M. et al. Penile cancer: an analysis of socioeconomic factors at a southeastern tertiary referral center. **The Canadian journal of urology**, v. 18, n. 1, p. 5524-5528, 2011.

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

MILLS, A. M. et al. HR-HPV E6/E7 mRNA In Situ Hybridization: Validation Against PCR, DNA In Situ Hybridization, and p16 Immunohistochemistry in 102 Samples of Cervical, Vulvar, Anal, and Head and Neck Neoplasia. **The American journal of surgical pathology**, v. 41, n. 5, p. 607-615, 2017.

MIMICA, M. et al. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. **Int J Gynecol Cancer**, n. 1, v. 20, p. 116-19, 2010.

MONTIEL-JARQUÍN, Á. J. et al. Five-year survival analysis in patients with penile cancer. **Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 55, p. S34, 2017.

MOSCONI, A. M. et al. Cancer of the penis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 53, n. 2, p. 165-177, 2005.

NAM, J.K. et al. Clinicopathologic Characteristics and Treatment Outcomes of Penile Cancer. **The world journal of men's health**, v. 35, n. 1, p. 28-33, 2017.

NOVARA, G. et al. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 4, n. 3, p. 140-146, 2007.

O'BRIEN, J.S. et al. Penile cancer: contemporary lymph node management. **The Journal of urology**, v. 197, n. 6, p. 1387-1395, 2017.

ORNELLAS, A.A. et al. Prognostic Factors in Invasive Squamous Cell Carcinoma of the Penis: Analysis of 196 Patients Treated at the Brazilian National Cancer Institute. **Journal of Urology**, n. 4, v. 180, p. 1354-59, 2008.

PAIVA, G.R. et al. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. **World J Urol**, v. 47, p. 295-299, 2015.

PETER, M. et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene**, v. 25, n. 44, p. 5985-5993, 2006.

PIZZOCARO, G. et al. EAU penile cancer guidelines 2009. **European urology**, v. 57, n. 6, p. 1002-1012, 2010.

POMPEO, A.C.L. et al. Projeto Diretrizes II. **Soc. Brasileira de Urologia**, São Paulo, p. 1-9, 2006.

POW-SANG, M.R. et al. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology**, v. 76, n. 2, p. S2-S6, 2010.

PINATTI, L. M.; WALLINE, H. M.; CAREY, T. E. Human Papillomavirus Genome Integration and Head and Neck Cancer. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 6, p. 691–700, 2018.

PRIGGE, E. S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; REUSCHENBACH, M. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 51-66, 2017.

PROTZEL, C. et al. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. **Histol Histopathol**, n. 11, v. 22, p. 1197-204, 2007.

PYEON, D. et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 2, 2009.

RAPOSO, M. C. L., RODRIGUES, A. P. R. A., MIRANDA, L. N., TENORIO, G. M. A educação em saúde e a prevenção do câncer de pênis. **Ciências Biológicas e Saúde**, n. 3, v. 3, p. 177-188, 2016.

REIS, A.A.S.; PAULA, L.B.; PAULA A.A.P.; SADDI, V.A.; CRUZ, A.D. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, p. 1105-1111, 2010.

RODNEY, S. HPV and penile cancer: perspectives on the future management of HPV-Positive disease. **Cancer network – home of the journal oncology**, v. 30, n. 3, p. 250-252, 2016. 2016.

RODRIGUES, A. D. et al. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 6, p. 457-62, 2009.

ROMAGOSA, C. et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. **Oncogene**, v. 30, n. 18, p. 2087-2097, 2011.

ROMERO, F.R.; ROMERO, A.W.; DE ALMEIDA, R.M.S.; OLIVEIRA, J.R.F.C.; TAMBARA FILHO, R. Prevalence and risk factors for penile lesions/anomalies in a cohort of Brazilian men >_ 40 years of age. **Int Braz J Urol**, v. 39, p. 55-62, 2013.

ROSITCH, A. F. et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. **International journal of cancer**, v. 133, n. 6, p. 1271-1285, 2013.

RONCAGLIA, M. T. et al. Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high-grade lesions of patients treated by conization with large loop excision. **Oncology Letters**, v. 6, n. 1, p. 63–68, 2013.

SAITO, Y. et al. Induction Chemotherapy for p16 Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **Laryngoscope Investig Otolaryngol**, n. 2, v. 2, p. 28-32, 2016.

SAND, F.L. et al. The prognostic value of p16 and p53 expression for survival after vulvar cancer: A systematic review and meta-analysis, **Gynecol Oncol**, n. 1, v. 152, 2019.

SENKOMAGO, V. et al. Higher HPV16 and HPV18 penile viral loads are associated with decreased human papillomavirus clearance in uncircumcised Kenyan men. **Sex Trans Dis**, v. 43, n. 9, p. 572-578, 2016.

SHAH, A. A. et al. Prognostic factors and 5-year survival of patients with carcinoma penis: Tertiary health center study. **Indian Journal of Cancer**, v. 53, n. 2, p. 309, 2016.

SHEN, C. et al. Long-distance interaction of the integrated HPV fragment with MYC gene and 8q24. 22 region upregulating the allele-specific MYC expression in HeLa cells. **International Journal of Cancer**, v. 141, p. 540-548, 2017.

SILVA, R. J. C. et al. Persistence and clearance of HPV from the penis of men infected and non-infected with HIV. **Journal of medical virology**, v. 83, n. 1, p. 127-131, 2011.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M.J. Base genética do câncer. In: **Fundamentos de Genética**. 6ª Edição. Ed. Guanabara Koogan, cap. 21 p. 574-590, 2013.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

SOUZA, V. C.; MARQUES, S.M.D. Câncer de pênis no Brasil: um problema de saúde pública. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, v. 11, n. 40, 2015.

STANKIEWICZ, E. et al. The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol**, n. 6, v. 65, p. 534-37, 2012.

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**, n. 3, v. 15, 2015.

STRATTON, K. L.; CULKIN, D. J. A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 30, n. 3, p. 245-249, 2016.

THAPA, S. et al. Warty Carcinoma Penis: An Uncommon Variant. **Case Reports in Pathology**, v. 2017, 2017.

THORLAND, E.C. et al. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. **Cancer Research**, v. 60, p. 5916-5921, 2000.

TORBRAND, C. et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality: a population-based study. **BJUI International**, p. 2-7, 2016.

TOUSSAINT-SMITH, E.; DONNER, D. B.; ROMAN, A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. **Oncogene**, v. 23, n. 17, p. 2988–2995, 2004.

TANG, X. et al. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 α protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 9, p. 2568–2576, 2007.

WANG, J.Y. et al. Histological subtype is a significant predictor for inguinal lymph node metastasis in patients with penile squamous cell carcinoma, **Asian Journal of Andrology**, n. 3, v. 20, p. 265-269, 2018.

WATANABE, M. et al. Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods. **Exp Ther Med**, n. 3, v. 14, p.2683-88, 2017.

WENTZENSEN, N. cancers. v. 139, n. 9, p. 2001–2011, 2019. SYBIL BIERMANN, J. et al. Bone Cancer: Clinical practice guidelines in oncology. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 11, n. 6, p. 688–723, 2013.

WHO. Tumours of the penis. In: **Who Classification of Tumours of the urinary system and male genital organs**. 4ª Edição, p. 259-285, 2016.

WOLBARST, A.. Circumcision and penile cancer. *The Lancet*, v. 219, n. 5655, p. 150-153, 1932.

XIE, S. et al. What is the Prognostic Significance of Ki-67 Positivity in Oral Squamous Cell Carcinoma? **J Cancer**, n. 7, v. 7, p. 758-67, 2016.

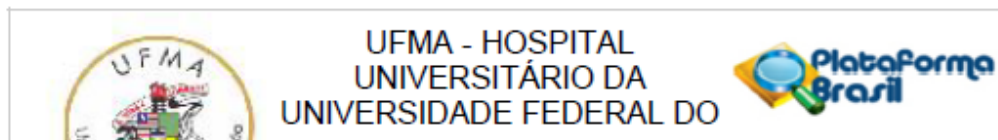
YANG, Z. et al. The relationship between human papillomavirus and penile cancer over the past decade: a systematic review and meta-analysis. **Asian Journal of Andrology**, n. 4, v. 21, p. 375-8, 2019.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, n. 6, p. 581-587, 1999.

ZHAO, J. W. et al. HPV16 integration probably contributes to cervical oncogenesis through interrupting tumor suppressor genes and inducing chromosome instability. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1–14, 2016.

8. ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS DE INTEGRAÇÃO GENÔMICOS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM TUMORES DE PÊNIS DE PACIENTES DO ESTADO DO MARANHÃO

Pesquisador: Gyl Eanes Barros Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 05918918.9.0000.5086

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.122.045

Apresentação do Projeto:

1.1 Aspectos Epidemiológicos

De acordo com os levantamentos epidemiológicos na área, o câncer de pênis (CaPe) é considerado uma neoplasia de ocorrência rara em países desenvolvidos, principalmente na América do Norte e Europa Ocidental. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, menos de um a cada 100.000 homens são afetados pela doença nos Estados Unidos, com estimativa de 2.320 novos casos e 380 mortes por CaPe para o ano de 2018 no país. No entanto, há uma alta incidência deste tipo de câncer em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, África e América do Sul (POW-SANG et al., 2010; CHRISTOULIDOU et al., 2015). Há poucos trabalhos que descrevam os aspectos etiológicos de CaPe quando

comparamos com o acervo de informações disponíveis para outros tipos de tumores (ROMERO et al., 2013). Sabe-se que a doença parece afetar mais frequentemente homens em condições socioeconômicas e educacionais desfavoráveis, sendo associada a fatores como idade, fimose, má higienização do pênis, tabagismo, etilismo, condições de inflamação crônica no pênis e infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) (CARVALHO et al., 2007; SENKOMAGO et al., 2016; RODNEY, 2016). Dentre os países da América do Sul, o Brasil representa a localidade com maior incidência da doença. Até o ano de 2017, de acordo com um levantamento realizado por Favorito e

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

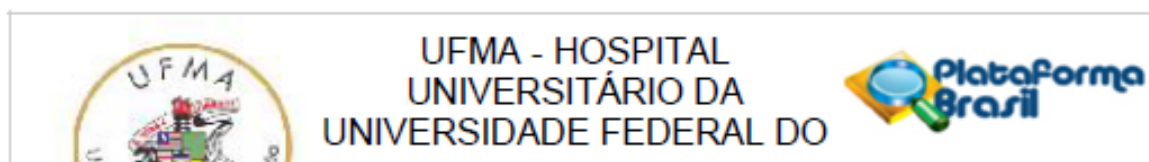
CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 3.122.045

Cronograma	_cronograma_.docx	28/12/2018 16:55:18	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	_projeto_.docx	28/12/2018 16:53:44	Gyl Eanes Barros Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 25 de Janeiro de 2019

Assinado por:

Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

9. Artigo científico

a. Periódico

Nome: BMC Urology

Webqualis CAPES: B1 (Medicina II)

Fator de impacto: 1.792

b. Normas editoriais/normas para autores (estudo de protocolo).

O artigo deve contar os seguintes tópicos: página título, resumo, introdução, metodologia, discussão, conclusão, lista de abreviação, declarações, notas especiais e referências.

Página título: apresentar um título que inclua, se apropriado, o desenho do estudo, por exemplo: "A versus B no tratamento de C: um estudo controlado randomizado", "X é um fator de risco para Y: um estudo de controle de caso", "Qual é o impacto do fator X no sujeito Y: Uma revisão sistemática" ou para estudos não clínicos ou não de pesquisa: uma descrição do que o artigo relata liste os nomes completos e endereços institucionais para todos os autores se um grupo de colaboração deve ser listado como autor, liste o nome do grupo como autor. Se você deseja que os nomes dos membros individuais do Grupo sejam pesquisáveis por meio de seus registros individuais do PubMed, inclua essas informações na seção "Agradecimentos" de acordo com as instruções abaixo.

Resumo: o resumo não deve exceder 350 palavras. Por favor, minimize o uso de abreviações e não cite referências no resumo.

Palavras-chave: três a dez palavras-chave representando o conteúdo principal do artigo.

Introdução: deve explicar os antecedentes do estudo, seus objetivos, um resumo da literatura existente e por que esse estudo é necessário ou sua contribuição para o campo.

Métodos: deve conter o objetivo, desenho e configuração do estudo características dos participantes ou descrição dos materiais; uma descrição clara de todos os processos, intervenções e comparações. Nomes genéricos de medicamentos

geralmente devem ser usados. Quando marcas proprietárias são usadas em pesquisas, inclua os nomes entre parênteses o tipo de análise estatística usada, incluindo um cálculo de potência, se apropriado.

Discussão: deve incluir uma discussão sobre quaisquer questões práticas ou operacionais envolvidas na execução do estudo e quaisquer questões não abordadas em outras seções.

Declarações: Todos os manuscritos devem conter as seguintes seções sob o título “declarações”: aprovação ética e consentimento em participar; consentimento para publicação; disponibilidade de dados e materiais; interesses competitivos; financiamento; contribuição dos autores; agradecimentos; informação dos autores (opcional). Se alguma das seções não for relevante para o seu manuscrito, inclua o cabeçalho e escreva 'Não aplicável' para essa seção.

Referências: Todas as referências devem ser enumeradas e citadas consecutivamente entre colchetes na ordem do texto. A lista de referências deve ser formatada antes da submissão.

c. Artigo

PENILE CANCER: AN INTEGRATIVE PROTOCOL OF AN AREA OF HIGH INCIDENCE IN NORTHEAST BRAZIL.

Antonio Augusto Lima Teixeira Júnior¹; Jaqueline Diniz Pinho²; Marta Regina de Castro Belfort²; Wesliany Everton Duarte ²; Liseana de Oliveira Barbosa³; Ciro Bezerra Vieira²; Thaís Bastos Moraes Sobrinho²; Antonio Lima da Silva Neto²; Thalita Moura Silva Rocha¹; José Ribamar Rodrigues Calixto⁴; Leudivan Ribeiro Nogueira⁵; Ronald Wagner Pereira Coelho⁶; Syomara Pereira da Costa Melo¹; Francisco Sérgio Moura Silva do Nascimento²; Antonio Machado Alencar Junior⁷; Gyl Eanes Barros Silva^{8*}.

¹Postgraduate Program in Adult Health (PPGSAD), Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

²Laboratory of Immunofluorescence and Electron Microcopy (LIME) - Presidente Dutra University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

³Department of Pathology, Presidente Dutra University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁴Department of Medicina II, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁵Urologist at Aldenora Bello Cancer Hospital, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁶Oncologist at Aldenora Bello Cancer Hospital, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁷Doctor at Presidente Dutra University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁸Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

*Correspondence: gyleanes@fmrp.usp.br; Barão Itapary Street, 227, 65020 070, São Luís, Maranhão. Brazil. Phone: +55 98 2109-6470.

ABSTRACT

The state of Maranhão, Brazil, has a higher worldwide incidence of penile cancer (PC), being considered a serious local public health problem. When compared to other cancers, data regarding epidemiological, etiological, histopathological, treatment, and follow-up aspects of PC still incipient, especially in this region. Thus, this prospective study aims to perform a better screening of PC cases in Maranhão, using a careful methodology both to clinical and laboratory approach, accompanying patients from the first medical consultation to postoperative. We also aim to have an impact on early diagnosis and reduction of the number of cases of the disease, also describing the perspective for research with penile cancer patients in the region. The study will be conducted at Aldenora Bello Cancer Hospital (HCAB), a referral center for PC treatment located in the state capital, São Luís. Patients will be screened through a mobile application that will be made available to the medical community, especially in the areas. where most of the cases come from. These patients will be referred to the HCAB, where the first consultation will be performed, with physical examination of the penis and other examinations necessary for diagnostic elucidation. In addition, an interview will be conducted to collect sociodemographic data. Once the diagnosis is made, the patient will be evaluated by the team of surgeons with experience in the area, who defined the best approach to be adopted for each patient. The surgical specimen will be subjected to full inclusion for detailed histological analysis, and fresh tumor fragments will be collected during surgery. This material will be used for tumor RNA and DNA extraction, which will be used for HPV detection and genotyping, HPV 16 variant analysis, HPV physical state definition, p53 and E6 polymorphism analysis, and bioinformatics assays. Formal fixed and paraffin embedded material will be used to evaluate the expression of important markers such as p16, p53, ki67, HPV-E6 and E7. By integrating the data from this prospective study, we

hope to contribute to a better understanding of the etiological aspects and biology of these tumors in Maranhão, in addition to improving the approach and follow-up of patients, from screening to treatment, linking clinical routine to laboratory research.

Keywords: penile cancer, Maranhão, study protocol.

Background

Penile cancer (PC) is a rare neoplasm in developed countries. However, it has a high incidence in developing one, mainly in some areas of Asia, Africa and South America [15]. When compared to others cancers, in PC, data regarding the epidemiological, etiologic, histopathological, treatment, and follow-up aspects of the disease still incipient.

Despite this, some risk factors have been proposed for PC [41]. The disease appears to be more prevalent in older men, living in rural zone and with low education levels [8]. Others risk factors such as tabagism, alcoholism, phimosis, poor hygiene of the penis, chronic inflammation conditions and infection by high-risk Human papillomavirus (HR-HPV) also may increase the risk for the disease [39].

According data from International Agency for Research on Cancer (IARC), the age-standardized rate (ASR) of PC in United States is 0.5/100.000 men, and still smaller in Jewish men born in Israel, with 0.1/100.000. The low age-standardized rate reported in Israel is commonly associated to the cultural practice of neonatal circumcision in this region, with appears to be a protective factor for disease.

In contrast, the highest incidence is report in Uganda, in Africa (5.6/100.000). According IARC, Brazil occupies the thirteenth position in the ranking of incidence of PC worldwide, with a rate of 1,6/100.000. In Brazil, despite the initiatives of IARC, when we analyze the number of cases used to calculated incidence, it's too small when we compared with data of local studies that describe with more details the reality of the disease in the country. Besides that, only cases from six cities is used by IARC to calculate national incidence.

Due de large number of under diagnosed cases, these local studies it's essential to understand better the real situation of PC in Brazil. These studies reveals the north and northeast of Brazil as the regions with highest incidence of the disease, especially the state of Maranhão.

In 2018, our study group published a retrospective study of 392 patients diagnosed with PC during 2004-2014 in Maranhão [54]. Despite our data are only collected in one referral center in the state, the calculated age-standardized incidence (ASR) revels a rate 13.89 per 100.000 men over an 11 years period, corresponding to an average ASR of 6.15 per 100.000 men over a 5-year period. The ASR of 6.1 per 100.000 men recorded exceeds the highest international rates reported by IARC. The state has rural socioeconomic characteristics, being historically marked by intense social inequalities and extreme poverty. In this context, access to basic health, especially in rural areas is scarce, making it difficult to carry out periodic consultations and consequently making it hard diagnose a serious number of diseases, including PC.

Our data reveals an alarming situation of PC in Maranhão. Most patients present in advanced stage at diagnosis, usually with local metastasis and requiring mutilating treatment. There's only two reference hospital to treatment of PC in Maranhão, both localized in the capital, and beside the high incidence of the disease in state, no standardized clinical protocol is used to approach these patients, in oncologic research level, the medical record generally presents with loss of basic information such as symptom onset, habits and addictions, etc. Besides that, no strategies are used for correct conduction of these patients, who in great majority lose hospital follow-up.

Due the large number of missing information in our first retrospective study, loss of patients follow-up and the absence of standardized protocol for PC in our hospital setting, we decided carry out a prospective study aiming to perform a better screening of

PC cases in Maranhão, using a careful methodology both to clinical and laboratory approach, accompanying patients from the first medical consultation to postoperative. We also aim to have an impact on early diagnosis and reduction of the number of cases of the disease. In addition, we described our perspective to research with these patients.

Methods/Design

Location

This study will be conducted at the Hospital do Câncer Aldenora Bello and at Hospital Universitário Presidente Dutra, in São Luís, Maranhão, Brazil.

Objectives

The objective of this study is to standardize the care of patients with penile cancer in one reference hospital in the state of Maranhão, a region with a high incidence of the disease. The main secondary objectives are to provide data on the clinical and epidemiological aspects of this type of tumor and to conduct research that best characterizes the histopathological and molecular aspects of the disease.

Design

This is a prospective study of a research group in penile cancer of the Federal University of Maranhão, Brazil. The eligible patients for this research are men older than 18 years, with clinical and histopathological diagnosis of PC and who formally agreed by signing

the consent form to participate in the research. Patients with previous chemotherapy and radiotherapy treatment or who do not require surgical intervention as the main therapeutic method will be excluded.

Patient Screening

Screening of penile cancer patients will be performed through a mobile application that will be developed and disseminated to the medical community of the state of Maranhão, in order to notify cases and referral to the referral center (Aldenora Bello Cancer Hospital), located in the capital of São Luís. With this approach it will be possible to minimize underreporting of cases of the disease in the state.

First medical appointment and preoperative analysis at reference center

Penile cancer patients referred to the referral hospital will initially be approached by a urologist. They will perform a physical examination and interview for the collection of clinical and socioeconomic data. Penile carcinoma is usually a clinically obvious lesion but it may be hidden under a phimosis. Physical examination should include palpation of the penis to assess the extent of local invasion and palpation of both groins to assess the lymph node status. Careful palpation of both groins for enlarged inguinal lymph nodes must be part of the initial physical examination of patients suspected of having penile câncer [1].

If there are no palpable lymph nodes, the likelihood of micro-metastatic disease is about 25%. Imaging studies are not helpful in staging clinically normal inguinal regions, although may be used in obese patients in whom palpation is unreliable [3]

Palpably enlarged lymph nodes are highly indicative of lymph node metastases. Physical examination should note the number of palpable nodes on each side and whether these are fixed or mobile. Additional imaging does not alter management and is not required. A pelvic CT scan can be used to assess the pelvic lymph nodes. Imaging with 18FDG-PET/CT has shown high sensitivity (88-100%) and specificity (98-100%) for confirming metastatic nodes in patients with palpable inguinal lymph nodes [43, 47]. After the physical examination and analysis of the imaging exams and definition of the type of surgical procedure to be adopted, the patient will be included in the hospital's surgery schedule.

Surgical aspects

There are no randomized controlled trials (RCTs) or observational comparative studies for any of the treatment options for localized penile cancer. Penile preservation appears to be superior in functional and cosmetic outcomes to partial or total penectomy, and is considered to be the primary treatment method for localized penile cancer. However, there are no RCTs comparing organ-preserving and ablative treatment strategies.

Histological diagnosis with local staging must be obtained before using non-surgical treatments. With surgical treatment, negative surgical margins must be obtained. Treatment of the primary tumour and of the regional nodes can be staged. Local treatment modalities for small and localized penile cancer include excisional surgery, external beam radiotherapy (EBRT), brachytherapy and laser ablation. Patients should be counselled about all relevant treatment options.

During the surgical procedure, fresh tumor fragments will be collected for molecular analysis of the cases. Fresh tissue samples collected for DNA extraction will be stored in TLN (400mM NaCl; 25mM TRIS HCl pH = 8.0; 50mM EDTA pH = 8.0) and samples intended for RNA extraction will be stored in RNA later TM stabilization solution.

Treatment of superficial non-invasive disease (PeIN)

Topical chemotherapy with imiquimod or 5-fluorouracil (5-FU) is an effective first-line treatment. Circumcision is advisable prior to the use of topical agents. Due to high persistence/recurrence rates, treatment must be assessed by biopsy and long-term surveillance is warranted. An insufficient response may signify underlying invasive disease. Significant inflammatory responses may occur [25, 45]. Complete responses have been reported in up to 57% of PeIN cases and in 74% of cases treated by circumcision and 5-FU without relapse. If topical treatment fails, it should not be repeated [4].

Laser treatment with a neodymium:yttrium-aluminium-garnet (Nd:YAG) or Carbon dioxide (CO₂) laser is an effective treatment option (Bandieramonte, G., et al. 2008; Meijer, R.P., et al. 2007). Visualisation may be improved by photodynamic diagnosis with the CO₂ laser. Rebiopsy for treatment control is mandatory [33].

Glans resurfacing, total or partial, can be a primary treatment for PeIN or a secondary option in case of failure of topical chemotherapy or laser therapy. Glans resurfacing consists of complete removal of the glandular epithelium followed by reconstruction with a graft (split skin or buccal mucosa). However, in one study in cases

of glans resurfacing for presumed PeIN, up to 20% of patients were found to have invasive disease on histopathological examination [45].

Treatment of invasive disease confined to the glans (category T1/T2)

Small and localised invasive lesions should receive organ-sparing treatment. Additional circumcision is advisable for glandular tumours. Foreskin tumours are treated by 'radical circumcision'. Local excision, partial glansectomy or total glansectomy with reconstruction are surgical options. External beam radiotherapy or brachytherapy are radiotherapeutic options. Small lesions can also be treated by laser therapy but the risk of more invasive disease must be recognised.

Treatment choice depends on tumour size, histology, stage and grade, localisation (especially relative to the meatus) and patient preference. There is no clear evidence as to the required width of negative surgical margins. With organ-sparing these can be minimal. For a general recommendation, 3-5 mm can be considered a safe maximum. A gradebased differentiated approach can also be used, with 3 mm for grade one, 5 mm for grade two and 8 mm for grade three. This approach has its limitations due to the difficulties with penile cancer grading [28, 35].

Radiotherapy is an organ-preserving approach with good results in selected patients with T1-2 lesions < 4 cm in diameter [29]. It can be given as external radiotherapy with a minimum dose of 60 Gy combined with a brachytherapy boost or as brachytherapy alone. Reported results are best with brachytherapy with local control rates ranging from 70-90% [13].

Treatment recommendations for invasive penile cancer (T3-T4)

Treatment of disease invading the corpora cavernosa and/or urethra (T3) is the glansectomy with distal corporectomy and reconstruction or partial amputation with reconstruction are standard. Radiation therapy is an option [17, 35].

Treatment of locally advanced disease invading adjacent structures (T4) is the extensive partial amputation or total penectomy with perineal urethrostomy is the standard advisable treatment. For locally advanced and ulcerated cases, neoadjuvant chemotherapy may be an option. Otherwise, adjuvant chemotherapy or palliative radiotherapy are options [28].

Management of regional lymph nodes

The management of regional lymph nodes is dependent on the clinical inguinal lymph node status. There are three possible scenarios. First, the clinical lymph nodes appear normal on palpation and are not enlarged. Secondly, the inguinal lymph nodes are palpably enlarged, either uni- or bilaterally. Thirdly, there are grossly enlarged and sometimes ulcerated inguinal lymph nodes, uni- or bilaterally [28].

Management of patients with clinically normal inguinal lymph nodes (cN0)

Risk stratification for the micro-metastatic inguinal lymph node disease depends on stage, grade and the presence/absence of lymphovascular invasion in the primary tumor [35]. pTa/pTis tumours and those with low grade have a comparatively low risk of lymphatic spread. Well-differentiated G1 pT1 tumours are considered low risk, pT1G2

intermediate risk and pT1G3 and all higher stage tumours are considered high risk for lymphatic spread [28].

Since no imaging technique can detect micro-metastatic disease, invasive lymph node staging is recommended for pT1 tumours of intermediate and high risk, as well as for T2-T4 tumours. Fine-needle aspiration cytology also does not reliably exclude micro-metastatic disease and is not recommended [51].

Invasive nodal staging can be done by modified inguinal lymphadenectomy (mILND). Modified ILND is an alternative option, whereby the medial superficial inguinal lymph nodes and those from the central zone are removed bilaterally, leaving the greater saphenous vein untouched. If lymph node metastasis is found, ipsilateral radical inguinal lymphadenectomy is indicated [19, 49].

Management of patients with palpable inguinal nodes (cN1/cN2)

With uni- or bilateral palpable inguinal lymph nodes (cN1/cN2), metastatic lymph node disease is highly likely. The notion that these may be inflammatory and that antibiotic treatment should first be used is unfounded and dangerous as it delays curative treatment [42]. Palpably enlarged groin lymph nodes should be surgically removed, pathologically assessed (by frozen section) and, if positive, a radical inguinal lymphadenectomy should be performed [42].

Pelvic lymphadenectomy

Patients with two or more inguinal lymph node metastases on one side and/or extracapsular lymph node extension need to undergo ipsilateral pelvic lymphadenectomy. This recommendation is based on a study in which the rate of positive pelvic nodes was found to be 23% in cases with more than two positive inguinal nodes and 56% in those with more than three positive inguinal nodes or extracapsular extension [24, 28]. In patients with pN2/pN3 disease, adjuvant chemotherapy is recommended after lymphadenectomy [23].

Management of patients with fixed inguinal nodes (cN3)

Patients with large and bulky, sometimes ulcerated, inguinal lymph nodes require staging by thoracic, abdominal and pelvic CT for pelvic nodes and systemic disease. In clinically unequivocal cases, histological verification by biopsy is not required. These patients have a poor prognosis. Multimodal treatment with neoadjuvant chemotherapy followed by radical lymphadenectomy in responders is recommended [7, 37].

Neoadjuvant Chemotherapy

According to Panday et al. (2006), patients with local regional advanced disease (i.e. T4 primary tumor, bulky or bilateral inguinal nodes or pelvic adenopathy) have a higher risk of recurrence if treated with surgery alone. Neoadjuvant chemotherapy can early treat circulating tumor cells in order to prevent the occurrence of distant metastasis and also provide a better surgical approach on patients with unresectable tumors who have a good response. There are no phase III trials that address this issue, but two-phase II

prospective studies showed a potential benefit of preoperative chemotherapy in this scenario, especially with combinations including platinum derivatives. The combination of paclitaxel, ifosfamide and cisplatin (TIP) provided a 50% objective response rate (ORR), with 10% of clinical complete responses (cCR) in patients with N2/N3 tumors, with no worse rate of postoperative complications compared to historic control, and a median overall survival (OS) of 17.1 months, and with 36.7% of patients free of relapse in the 50 months of follow-up [31]. Other study that used the combination of cisplatin, docetaxel and 5-FU (TPF) in patients with T4 or N3 tumors showed a 60% ORR and evidenced that chemotherapy responders had a better OS and disease-specific survival than non-responders [14].

Although these studies were performed on patients with *de novo* locally advanced disease, it is acceptable that patients with local recurrence after surgery that not received previous chemotherapy undergone neoadjuvant chemotherapy considering a further salvage resection, when not feasible at the time of recurrence.

Adjuvant Chemotherapy

There is no data from prospective studies that support the benefit of postoperative chemotherapy in patients with penile cancer submitted to surgery even in higher risk tumors, but a retrospective multi-institutional study evaluated the use of postoperative TIP, TPF or VMB (vinorelbine, methotrexate and bleomycin) in patients with positive pelvic lymph nodes (pN3) after primary tumor resection associated with inguinal and pelvic lymph nodes dissection, suggested a benefit in OS for those patients who undergone adjuvant chemotherapy compared to those who were submitted to surgery alone (21.7 vs. 10.1 months, respectively; $P = 0.048$) [46].

According to Giannatempo et al. (2014), patients that presents another high-risk feature, as bilateral or ≥ 3 unilateral positive inguinal nodes (pN2) and extranodal extension (pN3) can be considered to adjuvant chemotherapy based on another retrospective study data.

Sistemic treatment for metastatic disease

Patients with progressive disease after neoadjuvant chemotherapy, non suitable for surgery, or that presents distant metastasis should be treated on a palliative setting. Sistemic chemotherapy combinations are chosen according to patient performance status (PS). For patients with good PS (ECOG 0 and 1) and no severe comorbidities, we prefer triplets including cisplatin, taxane and 5-FU, as TIP or TPF, due to higher response rates on the neoadjuvant trials (50% to 60%) [14, 31]. We no longer use VMB (vinblastine, methotrexate and bleomicin) due to high toxicity and unavailability of bleomicin in our region. For patients not able to receive a chemotherapy triplet because of high toxicity, the combination of cisplatin and 5-FU can be used, with the median response rate of 32% [22]. For patients with contraindication to cisplatin regarded to renal dysfunction, a combination of carboplatin and paclitaxel can be an option [7]. Patients with ECOG 3 to 4 or who have important organic dysfunction or severe comorbidities are offered best supportive care.

Response evaluation

The response evaluation of systemic therapy (neoadjuvant or palliative) take in account the changing on symptoms, and reduction of metastatic even seen on the clinical examination or on the radiological images. Routinely we take baseline physical

examination, CT scans of pelvis, abdomen and thorax and laboratorial analysis of renal, hepatic and hematologic function. The CT scans are performed again after 2 to 3 cycles of chemotherapy, depending on the tolerability of treatment. Symptoms reporting and physical examination is performed each medical appointment with the clinical oncologist, which happens before each cycle of chemotherapy. The clinical criteria to response or disease progression is improvement or worsening, respectively, of pain or other symptoms related to tumor growth or observation of changings of size of the lesions on physical examination. The radiologic response criteria are based on RECIST 1.1 [44].

Histopathological analysis after surgical approach

Macroscopy

After the surgical procedure, the macroscopic description of the lesions will be performed following the Macroscopy Manual of the Pathology Service of the Ribeirão Preto Clinical Hospital (SERPAT - HCRP). The partial penectomy product will be initially photographed to record the visual aspects of the tumors. The surgical specimen will be evaluated for penis length and diameter and foreskin length and thickness. The lesion will be evaluated for size, color, growth type (papillary, warty or ulcerated), consistency (friable, soft, firm, fibroelastic), limits (well / poorly defined, infiltrative, expansive), location (glans, foreskin, coronal sulcus, body), infiltration levels (cancellous, cavernous bodies, urethra) and distance from the surgical margin. When lymph nodes are present, they will be evaluated for laterality, number of lymph nodes isolated and diameter of the largest and smallest lymph nodes.

Microscopy

The microscopic aspects will be evaluated according to protocol adapted from the Protocol for Examination of Specimens from Patients with Carcinoma of the Penis recommended by the College of American Pathologists. The following aspects will be addressed: lesion location, tumor focus, histological type (Non-HPV-related squamous cell carcinoma or HPV-related squamous cell carcinoma), degree of differentiation, infiltration levels (cavernous body, spongy, albuginous tunic, urethra), tumor thickness, lymphatic and vascular invasion, presence of associated in situ carcinoma, sarcomatoid transformation, presence of lymphocyte infiltrate, associated lichen sclerosus, budding and cluster tumor and koilocytosis. When lymph nodes are present, they will be evaluated for laterality, number of lymph nodes involved, diameter of the largest and smallest lymph nodes, presence of confluence and extranodal extension. Tumor staging will be performed according to the Pathologic Stage Classification (pTNM, AJCC 8th Edition).

Morphological changes suggestive of HPV infection

The histological diagnosis of human papillomavirus (HPV) will be performed by identifying koilocytes. The presence of koilocytosis provides important information for identifying HPV-associated lesions and has been widely used in screening for cases with virus infection. For koilocyte analysis, the three main criteria proposed by Abadi et al. (1998) will be considered: (1) Presence of perinuclear halo; (2) nuclear atypia; (3) presence of binucleations.

DNA and RNA extraction to research purpose

During each patient's surgical procedure, fresh tumor fragments will be collected for DNA and RNA extraction. Samples will be stored and used for research purposes. DNA samples will be initially used for molecular detection of human papillomavirus (HPV) and analysis of p53 protein genetic polymorphisms. For DNA isolation, the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen cat. 69504) will be adopted and for RNA isolation the RNeasy Mini Kit (Qiagen cat. 74104) will be used. Samples will be diluted in 50 μ L of elution buffer and evaluated for extraction quality by quantification on a NanoDrop® spectrophotometer with concentrations expressed in ng / μ L and 260/280 measurement purity (between 1.8 and 2,0) and 260/230 (above one). DNA samples will be stored in -20°C freezer and RNA in -80°C freezer.

HPV molecular detection and genotyping

Tumor DNA samples from each patient will be subjected to amplification quality control and initially subjected to qualitative PCR (Polymerase Chain Reaction) for the β -globin gene (268 bp fragment). β -globin positive samples are subjected to HPV detection by two-step PCR (nested PCR). In the first PCR a set of generic primers called PGMY09 / 11, described by GRAVITT et al. (2002), who produce a 450 bp fragment from the L1 region of the HPV capsid. GP5 + / 6 + primers (JACOBS et al., 1997), which generate a 170 bp amplicon, also corresponding to the L1 region of the viral capsid, are contained in the second PCR and are contained in the amplified 450 bp fragment in the first round of PCR. The amplicons are separated on 1.5% agarose gel, subjected to a constant voltage of 90V for 40 min, stained in SYBR TM Safe DNA Gel Stain and visualized in UV transilluminator. Positive are those who had amplification for β -globin and PGMY09 / 11 and / or GP5 + / 6 +. The fragments will be submitted to genotyping by the sequencing reaction with the DY Enamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, according to the

protocol suggested by the manufacturer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Sequenced samples will be genotyped by comparing sequences found with sequences available in genetic databases using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

HPV-16 variants

Following sequencing genotyping, HPV-16 positive cases will be subjected to PCR amplification of the E6 viral gene using primer sequences described by Sotlar et al. (2004). The amplicons will be subjected to the sequencing reaction alone and the results will be evaluated by the MEGA software (v. 6.0), comparing the sequences found with those described by Burk et al. (2013), being later classified into variants A, B, C or D, and subgroups.

HPV-16 physical state

HPV physical state analysis will be performed according to the HPV-IntG method, which directly analyzes the physical status of the human papillomavirus (HPV) genome by multiplex PCR, analyzing the integrity of the viral genes E1, E2, E4, HPV subtype E5, E6 and E7 16 and 18 and checking for recombination between the cellular genome and the viral genome in these regions. The primer sequences used and the in-house method of analysis have not been described as they are in patent application. The samples analyzed will be classified as: integrated, episomal and mixed.

P53 codon 72 polymorphism

The determination of the p53 genotype in exon four and codon 72 will be conducted by allelic discrimination using conventional PCR (Polymerase Chain Reaction) using the ArgF / R (141pb) and ProF / R (177bp) primers in separate tubes. As a positive control of each reaction, a pair of primers for the β -globin gene (366 bp fragment) will be used. 2.0 μ l of DNA from each tumor sample will be used in a 25 μ l end product reaction using the MASTER MIX PCR PLATINUM SUPERFI kit (ThermoFisher TM) following the thermocycling conditions specified by Brenna et al. (2004). The amplicons will be separated on a 2.0% agarose gel, subjected to a constant voltage of 90V for 40 min. Only those that have amplification for the β -globin gene (internal control) will be considered for analysis. In the analysis of agarose gel those that have application only for the ArgF / R primer or only for ProF / R primer will be considered homozygous (Arg / Arg or Pro / Pro) and those that have amplification for ArgF / R and ProF primers. / R simultaneously will be considered heterozygous (Arg / Pro). Later the fragments will be sequenced to confirm the genotype.

HPV-16 E6 and p53 molecular docking

The deduction of the amino acid sequences of E6 and P53 based on the sequences obtained will be performed by the online tool Expasy Translate Toll. In the online software I-TASSER will be made the three-dimensional modeling and the obtained three-dimensional structures will be viewed and modified in the software PyMOL 1.5.0.4. The docking of the interaction between p53 and E6 in order to analyze the binding affinity of both will be performed using PatchDock software (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>).

Immunohistochemistry

The protein expression profile of p16, p53, ki67, HPV-E6 and HPV-E7 will be evaluated by immunohistochemistry. Dako EnVision™ kit and processing on PT Link (DAKO) equipment will be used for all assays. Initially the blocks with representative areas of the tumor of each patient are refrigerated at -20°C for 60 minutes. For each block, 3µm-thick histological sections are made and placed on silanized slides suitable for immunohistochemistry. The slides are incubated in an oven for 30 minutes at 60 ° C to remove excess paraffin (deparaffinization). After this step, slides are immersed in a recovery solution containing Dako Target Retrieval Solution (10x) diluted 1:10 in distilled water, and temperature cycled in PT Link according to standard protocol provided by the supplier (pre - heating to 65 ° C; antigen recovery at 97 ° C for 20 minutes; cooling to 65 ° C). The slides are then washed in Dako Wash Buffer (1x) for five minutes. Subsequently, the following steps are performed: endogenous peroxidase block (5 min), application of monoclonal primary antibody to each marker evaluated (60 min); polymer application (20 min); 3.3 'Diaminobenzidine (DAB) chromogen staining (10 min), against Harris Hematoxylin staining (5 min) and slide assembly for optical microscope analysis.

Discussion

PC is a rare neoplasm in developed countries, which may indirectly justify the limitations in diagnostic and therapeutic methods for the disease, coupled with its higher incidence in developing countries, which often have research investment deficits. PC is considered a public health problem in Brazil, since there is a high incidence of the disease in the country, especially in the state of Maranhão, recently considered the place with the highest worldwide incidence of PC [54].

The epidemiological and clinical profile of patients described by Coelho et al (2018) in Maranhão is similar in certain points to that observed in other studies, especially those performed in regions with low socioeconomic indices such as Maranhão. Despite the importance of the data described by our research group in the article published by Coelho et al (2018) in a retrospective survey, many questions remain unanswered about the high rate of the disease in the state, besides the lack of clinical protocol that is applicable in local clinical practice and prospective studies to address these problems and provide better follow-up of these patients.

The first step of this study is patient screening. In works by De-Sousa et al (2015), Coelho et al. (2018) and Martins et al. (2018), it was observed that the vast majority of patients come from inland regions of Maranhão, where access to health is limited and the chances of underdiagnosed cases occur are higher. As a way to publicize the referral center and perform a better screening of these patients, we propose the development of an application that will be developed in partnership with the regional health authorities, which will be disclosed to the state's medical community, especially those who work in the interior of State. With this tool we aim to improve case notification and referral of patients with clinical suspicion of the disease to the referral center in the capital of Maranhão, São Luís.

Factors such as age, phimosis, poor hygiene, smoking, alcoholism, inflammatory conditions, sexual history, and human papillomavirus (HPV) infection have been widely considered to be risk factors for penile cancer [8]. In addition, the disease is more frequent in men with unfavorable socioeconomic and educational conditions [9, 38]. Thus, after receiving the patients at the referral center, in the first consultation in addition to the physical examination of the penis, we considered it extremely important to carry out a questionnaire to know the lifestyle of each patient. With this information we will be able

to evaluate if the risk factors already described for the disease actually make up the local sample, besides better characterizing the socio-behavioral aspects of the patients.

After the clinical approach at the first consultation with the urologist, the patient will be informed about the therapeutic options and the type of conduct that best fits his clinical condition. In cases of surgical procedure, the patient will be referred for preoperative evaluation. The main aims of the treatment of the primary tumor are complete tumor removal with as much organ preservation as possible without compromising oncological control. Local recurrence has little influence on long-term survival, so organ preservation strategies are justified [19].

During the surgical procedure we propose to collect fresh tumor samples for DNA and RNA extraction from these tumors for research purposes. Molecular assays based on DNA and RNA analysis have been widely used to better understand the mechanisms involved in cancer genesis, as well as in the search for biomarkers of diagnostic, prognostic and therapeutic value. The main utility of DNA samples will be for detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) by PCR. De-sousa et al. (2015) and Martins et al. (2018) describe a high prevalence of HPV-infected penile tumors in Maranhão, especially subtypes of high oncogenic risk, such as subtype 16. Interestingly, from the histological point of view, Coelho et al. (2018) also report a high prevalence. histological alterations suggestive of viral infection, as well as a large number of condimotamous tumors when compared to other studies [9]. With a detailed histopathological analysis and a well-designed methodology that addresses from the complete inclusion of the surgery piece to the microscopic analysis of various histological parameters, we also sought to describe cytological changes (koilocytes) in these tumors, as another method of detecting viral action.

Given the large number of HPV-positive cases already described, especially subtype 16, we will study the characteristics of these tumors for infection by this high-risk subtype oncogene. We will analyze the physical state of the viral genome. The physical state of the virus genome in the host cell seems to play an important role in the persistence of infection and injury induction. In cervical epithelial cells, the integration of the virus genome into the cellular genome is described as a crucial step in the evolution of intraepithelial neoplasms to invasive tumors [34]. E6 and E7 proteins are also believed to cooperate in disrupting chromosomal duplication and segregation mechanisms during mitosis, inducing genomic instability [21]. There are no concise data on this process in penile tumors.

For HPV-16 positive cases, we propose to evaluate the variants of this viral subtype, as they may determine greater or less aggressiveness to tumors. Furthermore, with the analysis of specific genetic polymorphisms, since cellular protein polymorphisms have been associated with higher susceptibility to HPV infection and persistence of infections. The best studied is found in exon 4 of codon 72 of protein p53 (Arg / Arg) [36]. This homozygous polymorphism was associated with a 7x higher risk of developing HPV-associated tumors when compared to the Arg / Pro and Pro / Pro polymorphisms [20]. In a study aimed at determining the p53 variant in uterine colon tumors of Brazilian women, it was observed that about 67% of them had homozygosis for this polymorphism and 33% were heterozygous (Arg / Pro) [55]. In addition, tumors infected with different variants of viral subtype 16 have variable clinical behavior [10].

By analyzing p53 polymorphisms and E6 protein sequence, it is possible to perform protein prediction and molecular docking analysis between these two proteins by bioinformatics. Bioinformatics arises through the need for tools to analyze a very large volume of data generated by molecular biology, making it possible through computational

analysis of DNA, RNA and protein sequences [2]. Molecular modeling is decisive in elucidating intra and intermolecular interactions, using computational methods for predicting 3D structures and protein function [30]. Molecular docking is an important computational tool that allows you to “snap” a ligand to its receptor and explore possible interaction sites between a compound and a protein of interest. This tool has been widely used in drug design and site-specific interaction studies, helping to understand the functioning of certain proteins and elucidate mechanisms of action.

We also will analyze the expression profile of p16, p53, ki67, HPV-E6 and HPV-E7. Overexpression of p16 is widely used as an indirect marker of high-risk HPV infection in several types of virus-associated tumors [16, 40]. Positivity for p53 has been linked to worse prognosis in CaPe, with low SLD and higher risk of lymph node metastasis [18]. Lopes et al. (2012) in multivariate analysis observed that p53 expression was an independent factor for the occurrence of CaPe lymph node metastasis. Expression of ki67 has been associated in head and neck tumors with increased proliferative index, tumor thinning, lymph node involvement and disease progression [21, 52]. In CaPe some studies have shown the same predictive value of worse prognosis and lower disease-free survival [6, 48]. The analysis of E6 and E7 was not described for penile cancer. We aimed to describe the expression profile of these proteins and use them as another HPV detection method.

By integrating the data from this prospective study, we hope to contribute to a better understanding of the etiological aspects and biology of these tumors in Maranhão, in addition to improving the approach and follow-up of patients, from screening to treatment, linking clinical routine to laboratory research.

List of Abbreviations

PC: penile cancer.

IARC: International Agency for Research on Cancer.

ASR: age-standardized rate.

EBRT: external beam radiotherapy.

DNA: deoxyribonucleic acid.

RNA: ribonucleic acid.

PeIN: penile intraepithelial neoplasia.

CT: computed tomography.

HPV: human papillomavirus.

PCR: polymerase chain reaction.

Declarations

Ethics approval and consent to participate.

The study was approved by the Scientific Commission—COMIC—HUUFMA with the opinion no. 2457/2014-60 and by the Research Ethics Committee of the University Hospital/CEP-HUUFMA with approval number: 1.093.435.

Consent for publication

All authors have read and approved the final version of the article.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Not applicable.

Acknowledgements

Not applicable.

REFERENCES

1. AFONSO, L. A. et al. High Risk Human Papillomavirus Infection of the Foreskin in Asymptomatic Men and Patients with Phimosis. **Journal of Urology**, v. 195, n. 6, p. 1784–1789, 2016.
2. ALBAGLI, S. Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. **Ciência da Informação**, v. 27, n. 1, p. 7–10, 1998.
3. ALKATOUT, I. et al. Squamous cell carcinoma of the penis: Predicting nodal metastases by histologic grade, pattern of invasion and clinical examination. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 29, n. 6, p. 774–781, 2011.
4. ALNAJJAR, H. M. et al. Treatment of carcinoma in situ of the glans penis with topical chemotherapy agents. **European Urology**, v. 62, n. 5, p. 923–928, 2012.
5. BANDIERAMONTE, G. et al. Peniscopically Controlled CO2 Laser Excision for Conservative Treatment of In Situ and T1 Penile Carcinoma: Report on 224 Patients. **European Urology**, v. 54, n. 4, p. 875–884, 2008.
6. BERDJIS, N. et al. Expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. **BJU International**, v. 96, n. 1, p. 146–148, 2005.

7. BERMEJO, C. et al. Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Aggressive Surgical Consolidation for Metastatic Penile Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Urology**, v. 177, n. 4, p. 1335–1338, 2007.
8. CARVALHO, N. S. DE et al. Associação entre HPV e câncer peniano: revisão da literatura. **DST. Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 19, n. 2, p. 92–95, 2007.
9. CHAUX, A. et al. Papillary squamous cell carcinoma, Not Otherwise Specified (NOS) of the penis: Clinicopathologic features, differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 223–230, 2010.
10. CHEN, A. A. et al. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. **Journal of Virology**, v. 89, n. 20, p. 10680–10687, 2015.
11. Moderated poster sessions: abstracts. **The European Journal of Public Health**, v. 22, n. suppl 2, p. 126–295, 2012.
12. DE SOUSA, I. D. B. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: Viral genotyping and clinical aspects. **BMC Urology**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2015.
13. DE CREVOISIER, R. et al. Long-Term Results of Brachytherapy for Carcinoma of the Penis Confined to the Glans (N- or NX). **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 74, n. 4, p. 1150–1156, 2009.
14. DJAJADININGRAT, R. S. et al. Neoadjuvant taxane-based combination chemotherapy in patients with advanced penile cancer. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 13, n. 1, p. 44–49, 2015.

15. FAVORITO, L. A. et al. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil.
International Braz J Urol, v. 34, n. 5, p. 587–591, 2008.
16. GEISLER, C. et al. The role of p16 expression as a predictive marker in HPVpositive oral SCCHN - A retrospective single-center study. **Anticancer Research**, v. 33, n. 3, p. 913–916, 2013.
17. GOTSADZE, D. et al. Is conservative organ-sparing treatment of penile carcinoma justified? **European Urology**, v. 38, n. 3, p. 306–312, 2000.
18. GUNIA, S. et al. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 65, n. 3, p. 232–236, 2012.
19. LEIJTE, J. A. P. et al. Recurrence Patterns of Squamous Cell Carcinoma of the Penis: Recommendations for Follow-Up Based on a Two-Centre Analysis of 700 Patients. **European Urology**, v. 54, n. 1, p. 161–169, 2008.
20. LIN, T.; MAK, N. K.; YANG, M. S. MAPK regulate p53-dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: Involvement of p53 phosphorylation and acetylation. **Toxicology**, v. 247, n. 2–3, p. 145–153, 2008.
21. LIU, Y. et al. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 5852–5864, 2016.
22. DI LORENZO, G. et al. Cisplatin and 5-fluorouracil in inoperable, stage IV squamous cell carcinoma of the penis. **BJU International**, v. 110, n. 11 B, p. 661–666, 2012.
23. LUCKY, M. A.; ROGERS, B.; PARR, N. J. Referrals into a dedicated British penile cancer centre and sources of possible delay. **Sexually Transmitted Infections**, v. 85, n. 7, p. 527–530, 2009.

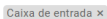
24. LUGHEZZANI, G. et al. The relationship between characteristics of inguinal lymph nodes and pelvic lymph node involvement in penile squamous cell carcinoma: A single institution experience. **Journal of Urology**, v. 191, n. 4, p. 977–982, 2014.
25. MANJUNATH, A. et al. Topical Therapy for non-invasive penile cancer (Tis)-updated results and toxicity. **Translational Andrology and Urology**, v. 6, n. 5, p. 803–808, 2017.
26. MEIJER, R. P. et al. Long-Term Follow-up After Laser Therapy for Penile Carcinoma. **Urology**, v. 69, n. 4, p. 759–762, 2007.
27. MIMICA, M. et al. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 20, n. 1, p. 116–119, 2010.
28. ORNELLAS, A. A. et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. **Journal of Surgical Oncology**, v. 97, n. 6, p. 487–495, 2008.
29. OZSAHIN, M. et al. Treatment of penile carcinoma: To cut or not to cut? **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 66, n. 3, p. 674–679, 2006.
30. O'DONOVAN, C.; APWEILER, R.; BAIROCH, A. The human proteomics initiative (HPI). **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 178–181, 2001.
31. PAGLIARO, L. C. et al. Neoadjuvant paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin chemotherapy for metastatic penile cancer: A phase II study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 24, p. 3851–3857, 2010.

32. PANDEY, D.; MAHAJAN, V.; KANNAN, R. R. Prognostic factors in node-positive carcinoma of the penis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 93, n. 2, p. 133–138, 2006.
33. PAOLI, J. et al. Penile intraepithelial neoplasia: Results of photodynamic therapy. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 86, n. 5, p. 418–421, 2006.
34. PETER, M. et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene**, v. 25, n. 44, p. 5985–5993, 2006.
35. PHILIPPOU, P. et al. Conservative surgery for squamous cell carcinoma of the penis: Resection margins and long-term oncological control. **Journal of Urology**, v. 188, n. 3, p. 803–808, 2012.
36. PILLAI, M. R. et al. Polymorphism at codon 72 of p53, human papillomavirus, and cervical cancer in South India. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 128, n. 11, p. 627–631, 2002.
37. PIZZOCARO, G.; PIVA, L. Adjuvant and neoadjuvant vincristine, bleomycin, and methotrexate for inguinal metastases from squamous cell carcinoma of the penis. **Acta Oncologica**, v. 27, n. 6, p. 823–824, 1988.
38. POW-SANG, M. R. et al. Epidemiology and natural history of penile cancer. **Urology**, v. 76, n. SUPPL. 2, p. S2, 2010.
39. RODNEY, S.; MUNEER, A. HPV and Penile Cancer: Perspectives on the Future Management of HPV-Positive Disease. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 30, n. 3, p. 250–252, 2016.
40. ROMAGOSA, C. et al. P16Ink4a overexpression in cancer: A tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. **Oncogene**, v. 30, n. 18, p. 2087–2097, 2011.

41. ROMERO, F. R. et al. Prevalence and risk factors for penile lesions/anomalies in a cohort of Brazilian men ≥ 40 years of age. **International Braz J Urol**, v. 39, n. 1, p. 55–62, 2013.
42. SAISORN, I. et al. Fine-needle aspiration cytology predicts inguinal lymph node metastasis without antibiotic pretreatment in penile carcinoma. **BJU International**, v. 97, n. 6, p. 1225–1228, 2006.
43. SCHLENKER, B. et al. Detection of inguinal lymph node involvement in penile squamous cell carcinoma by 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT: A prospective single-center study. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 30, n. 1, p. 55–59, 2012.
44. SCHWARTZ, L. H. et al. Committee. p. 132–137, 2017. A., SHAFIQ, C. W. N. S. S. J. R. B. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.
45. SHABBIR, M. et al. Glans resurfacing for the treatment of carcinoma in situ of the penis: Surgical technique and outcomes. **European Urology**, v. 59, n. 1, p. 142–147, 2011.
46. SHARMA, P. et al. Adjuvant chemotherapy is associated with improved overall survival in pelvic node-positive penile cancer after lymph node dissection: A multi-institutional study. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 33, n. 11, p. 496.e17-496.e23, 2015.
47. SOUILLAC, I. et al. Prospective evaluation of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computerized tomography to assess inguinal lymph node status in invasive squamous cell carcinoma of the penis. **Journal of Urology**, v. 187, n. 2, p. 493–497, 2012.

48. STANKIEWICZ, E. et al. The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 65, n. 6, p. 534–537, 2012.
49. TIETJEN, D. N.; MALEK, R. S. Laser therapy of squamous cell dysplasia and carcinoma of the penis. **Urology**, v. 52, n. 4, p. 559–565, 1998.
50. CHEN1, R. et al. Prostate cancer risk prediction models in Eastern Asian populations: current status, racial difference, and future directions. **Asian Journal of Andrology**, v. 21, n. July, p. 1–4, 2019.
51. WINDAHL, T.; ANDERSSON, S. O. Combined laser treatment for penile carcinoma: Results after long-term followup. **Journal of Urology**, v. 169, n. 6, p. 2118–2121, 2003.
52. XIE, S. et al. What is the prognostic significance of Ki-67 positivity in oral squamous cell carcinoma? **Journal of Cancer**, v. 7, n. 7, p. 758–767, 2016.
53. DE ANDRADE MARTINS, V. et al. P16 INK4a expression in patients with penile cancer. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–13, 2018.
54. COELHO, R. W. P. et al. Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: The highest incidence globally? **BMC Urology**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2018.
55. BAKHOUM, S. F. et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 467–472, 2018.

d. Comprovante de submissão

BURO-D-19-00596 - Please verify if you are a co-author 

BMC Urology Editorial Office <em@editorialmanager.com>
para Antonio

sáb., 14 de dez. 00:23 (há 2 dias) ☆ ↶ ⋮

Original article for other authors entitled "PENILE CANCER: AN INTEGRATIVE PROTOCOL OF AN AREA OF HIGH INCIDENCE IN NORTHEAST BRAZIL."
Authors: Antonio Augusto Lima Teixeira Junior, Jaqueline Diniz Pinho, Marta Regina de Castro Belfort, Wesleyan Everton Duarte, Liseana de Oliveira Barbosa, Ciro Bezerra Vieira, Thais Bastos Moraes Sobrinho, Antonio Lima da Silva Neto, Thalita Moura Silva Rocha, José Ribamar Rodrigues Calixto, Leudivan Ribeiro Nogueira, Ronald Wagner Pereira Coelho, Syomara Pereira da Costa Melo, Francisco Sérgio Moura Silva do Nascimento, Antonio Machado Alencar Junior, gyl Silva, PhD

Dear Author,
Dr gyl Silva has just submitted the above mentioned article to BMC Urology in which you are listed as a co-author.
Please click this link to verify that you are indeed a co-author, that you have substantially contributed to the article, and that you agree to the publication of it:
<https://www.editorialmanager.com/burol/asp?i=140223&i=JWKAYPDY>

Please click this link if you are not affiliated to the article:
<https://www.editorialmanager.com/burol/asp?i=140224&i=PSF135NL>

Thank you and kind regards,

Editorial Office
BMC Urology
<https://bmcurol.biomedcentral.com/>

10. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS (2018-2019)

- **Artigo:**

p16 expression in patients with penile cancer (co-autor)

Revista: PlosOne

Qualis Medicina II: A2

Fator de impacto: 2.77

Situação: publicado

- **Artigo:**

Evaluation of diagnosed cases of eye rhinosporidiosis in a public hospital of Maranhão, Northeast Brazil (co-autor)

Revista: BMC ophthalmology

Qualis Medicina II: B2

Fator de impacto: 1.77

Situação: publicado

- **Artigo**

MIR-107, MIR-223-3 and MIR21-5P reveals potential biomarkers in penile cancer (co-autor)

Revista: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention

Qualis Medicina II: B1

Fator de impacto: 1.50

Situação: aceito

- **Artigo:**

Analysis of epidemiological, histopathological, and clinical profile of patients with penile cancer in the region with the highest worldwide incidence (co-autor).

Revista: Scientific Reports

Qualis Medicina II: A1

Fator de impacto: 4.52

Situação: em revisão

- **Artigo:**

Angiolymphatic invasion and absence of koilocytosis predict lymph node metastasis in penile cancer patients and might justify prophylactic lymphadenectomy.

Revista: Medicine

Qualis Medicina II: B1

Fator de impacto: 1.88

Situação: em revisão

- **Premiação:**

Evento: 3rd International Workshop of HPV-related tumors

Colocação: 2º Lugar – Apresentações orais

- **Premiação:**

Evento: XIII MACCBIO - UEMA

Colocação: 1º Lugar – poster (Ciências da Saúde)