



Universidade Católica de Goiás
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado em Genética
Núcleo de Pesquisas Replicon

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE
PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM TUMORES
DE PÊNIS**

Goiânia, 2008



Universidade Católica de Goiás
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado em Genética
Núcleo de Pesquisas Replicon

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE
PAPILOMA VÍRUS HUMANO EM TUMORES
DE PÊNIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em
Genética da Universidade
Católica de Goiás – UCG,
como requisito para
obtenção do título de Mestre

Orientanda: Antoniella Fernanda Mendanha Sousa, B.Sc
Orientador: Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.
Co-Orientadora: Prof^{ta} Angela Adamski da Silva Reis, M.Sc.

Goiânia, 2008

Dedico este trabalho...

*A todos aqueles que me apoiaram incansavelmente,
que confiando em mim, dedicaram-me tempo e atenção.
Que se fizeram presentes em todos os momentos, alegres ou
tristes, e ainda continuam a incentivar-me
a crescer e a viver!!!!*

AGRADECIMENTOS

É chegado ao final de uma importante etapa da minha vida, portanto, é chegado o momento de agradecer a todos que estiveram presentes durante essa jornada.

Podê ser que um nome ou outro deixe de ser lembrado. Não por desmerecimento, mas simplesmente porque existiram tantas pessoas que contribuíram comigo que seria quase impossível lembrar-me de todos os nomes. Portanto, desde já, apresento minhas desculpas àqueles que não forem citados.

*Como em todos os momentos da minha vida, primeiramente, gostaria de agradecer a **Deus**. Não só por mais esta importante conquista, mas por tudo que tenho e sou.*

*Devo tudo a meus pais. Por isso, gostaria de registrar meus mais sinceros agradecimentos às pessoas mais importantes e amadas da minha vida. Ao meu querido papai, **Antonio José Rufino de Souza**, pois devo a ele cada segundo da minha trajetória. Ele, que com todo amor, não poupou medidas para realizar esse meu sonho. E sempre confiou em minha capacidade. Uma pessoa que admiro por tudo. À minha amada mãe, **Maria Pereira Mendanha Sousa**, pelo seu amor incondicional. Tão preocupada e zelosa, que me incentivou desde o primeiro instante. Agradeço por todos os seus cuidados e preocupações. Por cada palavra de carinho e conforto e por ter acreditado em mim mais até do que eu mesma, pois muitas vezes quando eu pensava em desistir, ouvia dela incentivo para continuar e estímulo para nunca fraquejar. A ela, em quem me espelho, meu muito obrigada.*

*As minhas queridas irmãs, **Marielle Sullivan Mendanha Sousa e Amanda Cristina Soares**, que sempre estiveram presentes em minha vida e sempre me fizeram mais feliz. Elas que são minhas companheiras e para sempre seguiremos juntas.*

*Ao meu querido namorado, **Thiago Santana Leopoldino**. Uma pessoa que amarei sempre! Uma pessoa que entrou em minha vida como uma luz e clareou meus dias. Ele que, em cada gel que não corava, sorria e não poupava palavras de incentivo e confiança. Ele que muitas vezes me consolou e me ajudou a continuar, com força e coragem.*

*Ao meu estimado orientador, **Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.**, o querido Prof^o **Peixoto**, agradeço primeiramente pela oportunidade que me foi confiada. Em minha trajetória ele foi bem mais que um orientador. Foi um grande amigo. Eu sempre disse que entrava na sala dele chorando e saía com um imenso sorriso. Uma pessoa que para mim sempre foi símbolo de confiança. Alguém que irei admirar eternamente, não só por toda sabedoria profissional, mas também pela pessoa maravilhosa que é.*

*À minha estimada co-orientadora, **Prof.^a Angela Adamski da Silva Reis, M.Sc.**, agradeço simplesmente por tudo. Acho que nem ela mesma sabe toda a importância que teve para mim durante todo esse tempo. Ela que me ensinou cada passo com toda atenção do mundo. Ela que disponibilizou tempo e paciência para me ajudar no que fosse preciso. Agradeço imensamente por todo carinho que dispensou a mim, chegando a me atender ao telefone até quatro, cinco vezes por dia. Praticamente*

tudo que aprendi devo a ela. A esta pessoa que admiro muito, só tenho a dizer: Obrigada, Angela!!! Pode contar comigo sempre.

Ao **Dr. Adriano Augusto Peclat de Paula**, pelo seu apoio vital na realização deste estudo, nos fornecendo as amostras e toda a orientação necessária. Aos **membros do Comitê de Ética** em pesquisa do Hospital Araújo Jorge pela aprovação da pesquisa e aos **responsáveis pelos prontuários** por nos fornecerem todos os dados necessários com muita atenção e rapidez.

À **Prof.^a Dra. Vera Aparecida Saddi**, outra importante pessoa a quem devo meus mais sinceros agradecimentos, por ter, muitas vezes, sentado comigo e tirado dúvidas e me ajudado. A **Prof.^a Vera** é uma pessoa que também admiro muito.

Quero agradecer ao **Prof. Cláudio Carlos da Silva, M.Sc.**, pela total atenção quando cheguei até ele pedindo que me ajudasse a fazer o mestrado. Agradeço profundamente por ter me apresentado ao **Prof. Peixoto**. Agradeço também pela atenção que ele teve comigo todas as vezes que nada dava certo e eu ficava chorando pra ele.

Às grandes pessoas que ajudaram também nessa jornada: **Prof.^a Daniela de Melo e Silva**, **Prof. Flávio Monteiro Ayres**, **Prof.^a Kátia Karina Verolli O. Moura**, ao **Eduardo Rocha Pedrosa** e à **equipe do LaGene**. A todos meu muito obrigada.

Aos meus amigos que estiveram comigo no laboratório e sempre me ajudaram nos momentos que precisei.

À uma garota muito inteligente, que sempre me estendeu a mão quando necessitei: **Caroline Dias Monteiro!!!** À ela dedico meus mais sinceros agradecimentos.

Não poderia deixar de agradecer à toda minha família, pois sei que todos torceram por mim. Meus primos: **Deni Dieques Amaral**, **Líria Dieques Amaral**, **Cindy Dieques Amaral**, **Douglas Silva Mendanha** e **Diego Silva Mendanha**, que estiveram muito próximos e agüentaram meu estresse. Aos meus **queridos avós**, que do jeitinho carinhoso deles, sempre estiveram ao meu lado. Aos meus **tios e tias**, meus amigos fora do meio científico, principalmente às minhas amigas **Ana Caroline Simari Nafra**, **Cristiane Harumi** e à minha amiga muito presente: **Neide F. dos Santos**.

Eu não teria conseguido sem todos vocês. Muito obrigada!!!!

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	x
Lista de Anexos	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. Introdução	17
2. Referencial teórico	24
2.1 – Histórico	24
2.2 – O Agente Etiológico	25
2.3 – Replicação viral, Integração e Carcinogênese	27
2.4 – O HPV e o câncer de pênis	35
3. Objetivos	42
3.1 – Objetivo Geral	42
3.2 – Objetivos Específicos	42
4. Material e Métodos	43
4.1 – Aspectos Éticos	43
4.2 – População de casos	43
4.3 – Amostras	43
4.4 – Extração de DNA das Amostras	44
4.5 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	44
4.6 – Eletroforese	46
5. Resultados	47
6. Discussão	54
7. Conclusão	60

8. Referências Bibliográficas	61
9. Anexos	73

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Organização do DNA circular do HPV e sua integração no DNA da célula hospedeira.....	27
Figura 2. Esquema mostrando as funções dependentes da diferenciação em células epiteliais normais e infectadas por HPV.....	27
Figura 3. Ação da proteína p53 sobre o ciclo celular. A - A proteína p53 é codificada pelo gene p53 localizado no cromossomo 17p13. A proteína p53 tem a função de parar o ciclo celular no caso de identificação de danos ao DNA, dessa forma o ciclo para até que o dano seja resolvido. No caso de danos extensos a p53 pode induzir a apoptose. B – A proteína viral E6 se liga a E6AP que funciona como uma ubiquitina, degradando p53. GMR: Genes do mecanismo de reparo.....	31
Figura 4. Ação da proteína pRb sobre o ciclo celular. A – A proteína pRb é codificada pelo gene RB1, localizado no cromossomo 13q14. A ligação da proteína pRb ao fator de transcrição E2F resulta na parada do ciclo celular. A fosforilação de pRb libera E2F que ativa a transcrição de genes alvos para a replicação do genoma. B - A proteína viral E7 se liga a proteína pRb, isoo libera E2F, causando um estímulo constante para a divisão celular.....	33
 RESULTADOS	
Figura 5. Frequência percentual da distribuição por topografia dos carcinomas estudados.....	47
Figura 6. Frequência percentual da distribuição dos carcinomas estudados por estadiamento pela classificação de Jackson (1966).....	49
Figura 7. Gel de poliacrilamida a 8% corado com Nitrato de Prata, contendo alguns dos produtos de amplificação, utilizando o conjunto de <i>primers</i> GAPDH, para confirmar a presença de DNA após a extração. O controle positivo foi uma amostra conhecida. Marcador molecular de tamanho de 50 pb.....	51
Figura 8-A. Gel de poliacrilamida a 8% corado com Nitrato de Prata, contendo produtos de amplificação para detecção de HPV utilizando o <i>primer</i> genérico GP5+/6+. Uma amostra de HPV 16 genotipada anteriormente foi usada como controle interno positivo. Marcador molecular de tamanho de 50 pb. Pacientes B, D e G positivos.....	52

Figura 8-B. Gel de poliacrilamida a 8% corado com Nitrato de Prata, contendo os produtos de PCR para genotipagem de HPV utilizando o *primer* tipo específico HPV 16. Marcador molecular de tamanho de 100 pb. Tamanho do fragmento do HPV 16 – 119pb. Uma amostra de HPV 16 genotipada anteriormente foi usada como controle positivo.....

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela I. Classificação dos tumores de pênis, segundo o estadiamento de Jackson ..	19
Tabela II. Classificação dos tumores de pênis, segundo o Sistema TNM.....	19

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Tabela III. Classificação dos HPV's quanto a categoria de risco oncogênico. Tipos virais associados a diferentes graus de lesões escamosas intraepiteliais carcinomas cervicais e pênis	25
Tabela IV. Prevalência de HPV em câncer de pênis em diferentes estudos.....	40

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela V. Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para confirmar a eficácia da extração de DNA (GAPDH), para detecção (GP5+/6+) e genotipagem de HPV, mostrando o tamanho do fragmento	45
--	----

RESULTADOS

Tabela VI. Descrição dos aspectos clínico-patológicos dos pacientes com tumores de pênis, segundo tipo de lesão e morfologia dos tumores.....	48
Tabela VII. Descrição dos aspectos clínico-patológicos dos pacientes com tumores de pênis, segundo hábitos de vida, fimose e tipo de tratamento	50
Tabela VIII. Prevalência dos tipos de HPV genotipados com os <i>primers</i> tipos-específicos	52
Tabela IX. Presença de co-infecção nos pacientes com HPV positivos detectados com o conjunto de <i>primers</i> GP5+/6+	53

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	73
Anexo 2. Dados dos Prontuários.....	76
Anexo 3. Protocolo do kit de extração e purificação de DNA genômico Wizard – Promega (<i>Promega Corporation, EUA</i>)®	79
Anexo 4. Protocolos de amplificação de DNA por PCR e protocolos de termociclagem	80
Anexo 5. Protocolo para o preparo de gel de poliacrilamida a 8%	84
Anexo 6. Protocolo de coloração rápida pelo nitrato de prata.....	86
Anexo 7. Informações Sobre os <i>Primers</i> Utilizados	87
Anexo 8. Submissão do artigo	94
Anexo 9. Artigo	97

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina, base nitrogenada
ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
ACP	Aspectos Clínico - patológicos
C	Citosina, base nitrogenada
Ca	Carcinoma
CDK	Quinase Ciclina-Dependente
C-	Controle negativo da reação
C+	Controle positivo da reação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNE	Dados não encontrados
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dTTT	Desoxitimidina trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfato
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>et al.</i>	Abreviatura de <i>et alii</i> que significa <i>e outros</i>
F	<i>Primer</i> de amplificação direta (<i>Forward</i>)
G	Guanina, base nitrogenada
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
g	Grama
GP05+/06+	<i>Primers</i> genéricos para amplificação de genoma HPV
h	Hora
H AJ	Hospital Araújo Jorge
HCl	Ácido Clorídrico
HPV	Papiloma Vírus Humano (<i>Human Papilloma Vírus</i>)
H₂O	Água
H₂O_d	Água deionizada
H₂O_{miliQ}	Água miliQ (ultra-pura)

IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
L	Litro
kDa	kilo Dalton
LaGene	Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular
LCR	Longa Região de Controle (<i>Long Control Region</i>)
M	Molar
MM	Marcador Molecular
mg	Miligramas
Mg⁺²	Íon Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
N/A	Não Aplicável
Na⁺	Íon Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NPR	Núcleo de Pesquisas Replicon
ORF	Open Reading Frames
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
PBS	Solução Tampão de Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
p53	Proteína p53
pRb	proteína Retinoblastoma
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	<i>Primer</i> de amplificação reversa (<i>Reverse</i>)
rpm	Rotação por minuto
SU-HAJ	Serviço de Urologia do Hospital Araújo Jorge
T	Timina, base nitrogenada
TBE	Tris-Borato de EDTA

TNM	Sistema de classificação por estadiamento: Tumor, Nódulos linfáticos e Metástases à distância
UCG	Universidade Católica de Goiás
URR	Região Regulatória a Montante (<i>Upstream Regulatory Region</i>)
Vol.	Volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol	Micromol

RESUMO

O Câncer é uma consequência de alterações genéticas ou epigenéticas em uma variedade dos genes que são fundamentais ao processo de crescimento, proliferação, diferenciação e morte programada da célula. Atualmente, essa doença, configura-se um dos principais problemas da saúde mundial, e no Brasil, representa a segunda causa de óbito na população adulta. O câncer de pênis é um tipo raro de neoplasia, que acomete indivíduos de países subdesenvolvidos com baixo nível social e precários hábitos de higiene associado à fimose e não circuncizados. No Brasil a incidência varia conforme a região estudada: 5,5% a 16% nas regiões Norte e Nordeste de 1 a 4% nas regiões Sul e Sudeste e 3,8% na região Centro-Oeste. Este tipo de câncer ocorre frequentemente entre a quarta e sétima décadas de vida, com 97% dos casos representados pelo carcinoma epidermóide. No entanto, indivíduos jovens também podem ser afetados. Estudos epidemiológicos e moleculares têm identificado a associação entre o Papilomavírus Humano (HPV) e carcinoma de pênis. O genoma desse vírus já foi identificado em 15-80% dos casos desse tipo de tumor, sendo os subtipos de alto risco oncogênico (16 e 18), os mais frequentes. Os objetivos do estudo foram detectar e genotipar HPV em espécimes biológicos de tumor de pênis e determinar as possíveis associações existentes entre a presença dos tipos virais e os aspectos clínico-patológicos (ACP) dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Serviço de Urologia do Hospital Araújo Jorge (SU-HAJ), no período de 2001 a 2006 e identificar o genoma do HPV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram diagnosticados 29 pacientes no SU-HAJ e os ACP foram obtidos a partir dos prontuários e tabulados com estatística descritiva. As amostras de tecido com carcinoma peniano foram submetidas à extração de DNA e posteriormente realizada as reações de PCR. Nestas, utilizou-se os *primers* GAPDH, GP5+/6+ e tipo-específicos, como controle interno da reação, detecção de qualquer tipo de HPV e genotipagem, respectivamente. A média das idades foi de 61,5 anos. Para topografia, observou-se 24% para haste, 28% para glândula, 16% para glândula e prepúcio, 12% para glândula e haste, 8% para prepúcio e 12% para outras especificações. A morfologia de maior prevalência foi carcinoma escamoso invasor variando do grau I ao IV. No estadiamento (classificação de Jackson), foi verificado 32% para Jackson I, 36% para Jackson II, 24% para Jackson III e 8% para Jackson IV. O tratamento de escolha para a maioria dos casos foi a penectomia parcial, sendo que 32% dos pacientes apresentaram metástases e 72% dos pacientes apresentaram fimose. Na avaliação molecular, o conjunto de *primers* GAPDH mostrou-se amplificado em todas as amostras analisadas, demonstrando eficácia na extração de DNA. A amplificação para o genoma viral com os *primers* GP5+/6+ foi observada em 34,48% (10/29) e o tipo mais frequente de HPV foi o 16. Os estudos sobre a associação entre o HPV e os tumores de pênis são importantes, pois podem avaliar a relação desse vírus com o processo de iniciação e promoção de tumores, junto a outros fatores de risco, como a fimose, má higiene, o tabagismo e a promiscuidade.

Palavras-chave: câncer de pênis, HPV, PCR, genotipagem molecular.

ABSTRACT

Cancer arises as a consequence of genetic or epigenetic alterations in genes that have a variety of different influences on the cell cycle, including cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis. Nowadays, cancer is among the most prevalent, costly, and preventable of all health problems. In Brazil, it represents the second cause of death of the adult population. Penile cancer is a rare disease, generally more prevalent in poor populations from developing countries, associated with precarious hygiene habits, especially of uncircumcised men. Penile cancer incidence varies across Brazilian geographical regions and it is more common on the North and Northeast regions. Penile cancer usually develops between the fourth and seventh decade of life and Squamous Cell Carcinoma accounts for up to 97% of all penile cancers. Molecular and epidemiological data has found strong evidence of the presence of HPV genome associated with penile carcinomas. The prevalence of HPV genome has been reported to be as high as 80%, depending on the sensitivity of the detection method and the selection of the tumor type. High-oncogenic-risk viral genotypes 16 and 18 are the most common types detected in association with penile tissue. The general objective of the current study was to detect and genotype HPV genome associated with penile cancer tissue using the polymerase chain reaction (PCR) assay. Furthermore, the potential association between the presence of HPV in the samples and the clinicopathological aspects of all cases was also investigated. The study group comprised of 29 cases diagnosed with penile carcinomas at the Urology Department/Hospital Araújo Jorge in Goiânia from 2001 to 2006. Total DNA was isolated from frozen tumor tissue and HPV DNA amplification was performed using GP5+/6+ primer pairs. Samples identified as positive for HPV DNA were genotyped with type-specific primer pairs. Appropriate positive and negative PCR controls were run with all reactions. As an internal control, a fragment of the GAPDH gene was also amplified. In our study, the mean age at the diagnosis was 61,5 years. With respect to tumor topography, 24% was present on the penile shaft, 28% on the glans, 16% on glans and foreskin as the three most frequent observations. Regarding Jackson's staging, 32% of the cases were J-I, 36% J-II, 24% J-III, and 8% J-IV. Partial penectomy was the most frequent surgical approach during treatment, 32% of all cases had metastasis and phimosis was present in 72% of the patients. HPV genome was amplified in 34,5% (10/29) of samples, and HPV-16 was the most prevalent. HPV role in penile cancer must be investigated and viral infection should be considered an import risk facto for penile cancer development, most likely to be implicated in tumor initiation, and should be investigated in association with the occurrence of phimosis, poor hygiene habits, chronic smoking, and individual promiscuity.

Key words: penile cancer, HPV, PCR, molecular genotyping.

1. Introdução

O câncer é uma patologia que aparece em consequência de alterações genéticas ou epigenéticas em uma variedade de genes que são fundamentais ao processo de crescimento, proliferação, diferenciação e morte programada da célula (El-Zein *et al.*, 2005). Atualmente, essa doença, configura-se um dos principais problemas da saúde pública mundial e no Brasil, representa a segunda causa de óbito na população adulta (Tonon *et al.*, 2007).

O câncer cervical é o tipo mais freqüente entre as mulheres (Dell & Gaston, 2001), chegando a serem diagnosticados 470.000 novos casos todo ano no mundo (Jansen & Shaw, 2004). Já nos homens, o câncer de pênis, constitui uma neoplasia rara nos países desenvolvidos, como Estados Unidos e Europa, correspondendo a 0,4% das neoplasias malignas (Micali *et al.*, 2006). Além de apresentar índices de morbidade e mortalidade severos, o câncer de pênis é uma doença que causa agravos psicológicos significativos e tem aumentado de forma dramática em muitas partes do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (Prowse *et al.*, 2008; Micali *et al.*, 2006; Dorfman *et al.*, 2006).

No Brasil, o tumor representa 2% de todos os casos de câncer no homem, sendo mais freqüente nas regiões Norte e Nordeste do que nas regiões Sul e Sudeste. Nas regiões de maior incidência, o câncer de pênis supera os casos de câncer de próstata e de bexiga (INCA, 2008). A incidência deste tipo de câncer ocorre entre a quarta e a sétima décadas de vida, com 97% dos casos representados pelo carcinoma epidermóide. No entanto, indivíduos jovens também podem ser afetados. Aproximadamente 22% dos casos ocorrem em pacientes com idade inferior a 40 anos (Reis, 2005).

A disseminação do câncer de pênis se faz, preferencialmente, por via linfática, acometendo, inicialmente, os linfonodos das regiões inguinais. As metástases inguinais

podem ser tratadas cirurgicamente, mas se houver a disseminação para qualquer órgão, a chance de cura torna-se bastante reduzida (Pompeo, 1993). A extensão e a localização desses tumores e, principalmente, o comprometimento dos linfonodos inguinais e ilíacos têm relação significativa com o prognóstico e a sobrevida global dos pacientes (Horenblas e Van Tinteren, 1994; Lopes *et al.*, 2000).

O câncer do pênis é, na maioria dos casos, originário de células epiteliais escamosas, incluindo os carcinomas *in situ*, que são restritos ao epitélio e não são infiltrativos, e os carcinomas invasivos. Os carcinomas *in situ* são conhecidos como Eritroplasia de Queyrat e doença de Bowen (Tonon *et al.*, 2007; Micali *et al.*, 2006). Os tipos histológicos mais comuns dos carcinomas invasivos são o carcinoma epidermóide invasivo e uma variante deste, o carcinoma verrucoso (Micali *et al.*, 2006; Ornellas *et al.*, 1994). A evolução do carcinoma epidermóide de pênis é lenta. Esses tumores originam-se na glândula em 80% dos casos, no prepúcio em 15% e no sulco coronal em 5% (Droller, 1980).

Os tumores de pênis são classificados histologicamente segundo a graduação de Broders: grau I - bem diferenciado; grau II - moderadamente diferenciado; e grau III - indiferenciado. Os tumores bem diferenciados não apresentam células anaplásicas, enquanto os indiferenciados apresentam mais de 50% de células anaplásicas (Micali *et al.*, 2006; Cabanas 1977).

Esses tumores apresentam também outra forma de classificação, o estadiamento. Esta classificação das neoplasias fornece elementos para que a melhor opção terapêutica seja instituída e contribui também para o prognóstico e sobrevida dos pacientes. Atualmente, entre os vários sistemas de estadiamento que existem, os mais utilizados são o sistema de Jackson (Jackson, 1966) e o TNM (Micali *et al.*, 2006).

O modelo de Jackson é o mais antigo e o mais utilizado. Ele classifica a doença em quatro estádios clínicos (Tabela I). O sistema TNM leva em consideração o tamanho do tumor e seu grau de infiltração em profundidade (T), a situação dos linfonodos regionais (N), e a presença ou ausência de metástases a distância (M) (Micali *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 1996) (Tabela II).

Tabela I. Classificação dos tumores de pênis, segundo o estadiamento de Jackson (Jackson, 1966; Fraley *et al.*, 1985; Pettaway & Lynch, 2002).

Estádio I	Tumor acometendo glândula e prepúcio
Estádio II	Invasão de corpos cavernosos ou haste peniana, sem gânglios comprometidos ou metástases a distância
Estádio III	Metástases para linfonodos inguinais
Estádio IV	Tumor invadindo estruturas adjacentes, presença de massas pélvicas, ou metástases a distância

Tabela II. Classificação dos tumores de pênis, segundo o Sistema TNM (Lopes *et al.*, 1996; De Paula *et al.*, 2005; Micali *et al.*, 2006)

T - Tamanho do tumor e grau de Infiltração

Tx	Tumor não definido
T0	Sem evidências de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (doença de Bowen ou Eritroplasia de Queyrat)
Ta	Carcinoma verrucoso não-invasivo
T1	Tumor invadindo tecido conjuntivo sub-epitelial
T2	Tumor invadindo corpo esponjoso ou cavernoso
T3	Tumor invadindo uretra ou próstata
T4	Tumor invadindo outras estruturas adjacentes

N – Situação dos linfonodos

Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo regional superficial
N2	Metástase em linfonodos múltiplos ou bilaterais inguinais superficiais
N3	Metástase em linfonodos regionais inguinais profundos ou pélvicos, uni ou bilaterais

M – Metástases

Mx	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância

M1	Presença de metástase à distância
M1a	Metástases ocultas
M1b	Metástases únicas em um único órgão
M1c	Metástases múltiplas em um único órgão
M1d	Metástases em múltiplos órgãos

Após a classificação da neoplasia, a equipe médica pode decidir qual é o melhor tratamento para o paciente. A cirurgia é a principal forma de tratamento do tumor primário no carcinoma de pênis e consiste na remoção do tumor com margem de segurança adequada, objetivando ao máximo a preservação do órgão (Pompeo e Gil, 2005). De forma a aumentar o tempo ou a qualidade de vida do paciente, vários tipos de cirurgia podem ser utilizadas, desde postectomia até amputação do órgão (Horenblas & Van Tinteren, 1994; de Paula *et al.*, 2005; Micali *et al.*, 2006).

A penectomia parcial ou total é a modalidade terapêutica mais utilizada atualmente, com controle local da neoplasia em mais de 90% dos casos, enquanto as postectomias, mesmo em lesões restritas ao prepúcio, têm índice de recidiva de até 30%. O procedimento cirúrgico da lesão primária do carcinoma de pênis visa o tratamento local com mínima recorrência, assim como resultado estético e funcional aceitável. A excisão local da lesão e a postectomia ampliada, apesar de oferecerem ótimos resultados estéticos, apresentam índices de recidiva muito altos de até 32%, devendo ter uma indicação restrita (Skinner *et al.*, 1972; Pompeo e Gil, 2005).

A etiologia do câncer de pênis permanece obscura, porém, a presença de fimose, a má higiene, alguns agentes infecciosos como o Papilomavírus Humano (HPV) e o grande número de parceiros sexuais são considerados fatores de alto risco para o desenvolvimento desta neoplasia (Barrasso *et al.*, 1987; Maiche, 1992; Maden *et al.*, 1993). Entretanto, o mecanismo

molecular exato que mostra como esses fatores aumentam o risco do câncer de pênis, permanece indeterminado (Rubin *et al.*, 2001).

A presença de fimose é freqüente em pacientes com câncer de pênis, sendo observada em 44 a 85% dos casos e considerada como fator de risco (Micali *et al.*, 2006). A circuncisão é a cirurgia para retirada da fimose. Muitos estudos têm mostrado que este procedimento pode reduzir o risco do câncer de pênis e infecções do trato urinário (Castellsagué *et al.*, 2002; De Paula *et al.*, 2005; Micali *et al.*, 2006). Sabemos também que esta cirurgia facilita a higienização adequada da glândula (De Paula *et al.*, 2005), e segundo Van Howe (2007) houve um decréscimo no risco de infecções sexualmente transmissíveis em homens circuncidados (Van Howe, 2007).

Em populações onde a prática de circuncisão neonatal é comum, como nos judeus onde a razão para esse procedimento é uma prática religiosa, a incidência do câncer de pênis é rara (Micali *et al.*, 2006). Nos EUA, onde esta prática também é comum, a incidência desta neoplasia é de 1%. Já em algumas tribos da África que não apresentam o hábito cultural da circuncisão, o câncer de pênis chega a 10-20% das neoplasias que acometem o sexo masculino (Dodge, 1965; Van Howe, 2007). Entretanto, é importante ressaltar que o efeito preventivo da circuncisão só ocorre quando ela é realizada ao nascimento ou em idade precoce. A prática da circuncisão na fase adulta mostrou resultados controversos para a prevenção do carcinoma peniano (Micali *et al.*, 2006).

Uma higiene genital pobre, mesmo com ausência de fimose pode ocasionar retenção de microorganismos e secreções, incluindo o smegma, que é o produto da degradação bacteriana das células prepúciais que sofreram esfoliação e tem se mostrado carcinogênico em animais. Embora ainda não tenha sido encontrado um agente específico causador de câncer no smegma, sabemos que ele pode causar inflamações crônicas e infecções recorrentes que levam

à adesão do prepúcio e conseqüentemente à fimose. Sabemos também que a ausência da circuncisão dificulta a higienização adequada da glândula, que associada à presença do *Mycobacterium smegmatis*, pode causar irritação crônica do epitélio e pode contribuir para a gênese do câncer de pênis (De Paula *et al.*, 2005; Micali *et al.*, 2006).

Em 1903, Borrel admitiu o papel de agentes infecciosos como causa de câncer (Griffiths & Mellon, 1999). Atualmente, estima-se que 15% dos tumores humanos sejam causados por vírus (IARC, 1995). De fato, estudos epidemiológicos em câncer de pênis demonstraram a associação de um vírus sexualmente transmissível, o HPV, com lesões benignas e malignas (Pow-Sang *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2001).

Outras pesquisas avaliaram o comportamento sexual do homem com presença do DNA desse agente viral no pênis e o risco de desenvolvimento de neoplasia cervical em suas parceiras sexuais (Bosch *et al.*, 1996; Shew & Fortenberry, 2005). Foi demonstrado que os homens que tinham o hábito de se relacionarem sexualmente com prostitutas aumentavam o risco do câncer cervical em suas parceiras. Estudos epidemiológicos confirmam que o comportamento sexual pode ser considerado como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer cervical. Portanto, é possível reconhecer o papel potencial do HPV como agente carcinogênico (Reis, 2005; Bosch *et al.*, 1996; De Paula *et al.*, 2005; Micali *et al.*, 2006).

As diversas formas de tratamento do carcinoma peniano, em particular, visam a uma sobrevida livre do tumor e com um mínimo de morbidade e seqüelas funcionais após o tratamento. Porém, os diversos procedimentos cirúrgicos atualmente utilizados como recurso terapêutico para tratar o câncer de pênis carregam uma carga mutilante do ponto de vista funcional e estético, afetando a auto-imagem com implicações psicológicas graves, além de

apresentarem índice de complicações cirúrgicas inerentes aos procedimentos adotados (Horenblas & Van Tinteren, 1994).

Sabendo então, dos problemas ocasionados pelos tratamentos cirúrgicos, é importante ressaltar que a circuncisão precoce e a higiene adequada podem, portanto, prevenir a ocorrência do câncer de pênis na idade adulta. O comportamento sexual também está diretamente relacionado ao desenvolvimento neoplásico, uma vez que os agentes etiológicos das doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como o HPV possui associação na formação dos carcinomas penianos. Portanto, esclarecer a população no sentido da prevenção do câncer de pênis, pode proporcionar a redução da incidência, da severidade da doença e evitar tratamentos agressivos, uma vez que o conhecimento de que os maus hábitos de higiene da genitália, associados ao efeito carcinogênico da fimose e a promiscuidade estão envolvidos no desenvolvimento do processo neoplásico (Gilliland & Key, 1995).

2. Referencial Teórico

2.1- Histórico

As verrugas genitais, também conhecidas como condilomas, causadas pelo HPV, foram descritas na Antiguidade. Mas somente no século XX a etiologia viral dessas verrugas pôde ser confirmada mediante experimentos de inoculação de extratos genitais em regiões da pele previamente escarificadas, que promoviam lesões típicas exatamente nesses locais inoculados (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

Em 1954 Barret *et al.*, confirmaram a transmissão sexual dessas lesões por HPV quando, após a guerra da Coréia, esposas de soldados também desenvolveram lesões genitais, contraídas de seus maridos que se infectaram durante a guerra.

Atualmente, o HPV é considerado o agente causador da doença sexualmente transmissível (DST) mais comum, entre populações humanas sexualmente ativas. Adicionalmente, foi estabelecido um link causal entre a infecção por HPV e a ocorrência de câncer cervical (Partridge & Koutsky, 2006). Shope & Hurst (1933) foram os primeiros a relatar a progressão de lesões papilomatosas a câncer, mediante a indução de infecções experimentais em coelhos. Os autores observaram que as lesões benignas induzidas por papilomavírus progrediam para carcinoma invasivo nos coelhos do grupo testado.

O interesse pelo estudo dos HPVs aumentou de forma expressiva a partir de 1970. Um estudo pioneiro de Meisels *et al.*, 1976, descreveu que as alterações morfológicas e displasias celulares observadas nos exames de Papanicolau e biópsias da cérvix uterina estavam freqüentemente ligadas à presença de HPV nesta região anatômica. Ainda na década de 70, zur Hausen (1977) iniciou pesquisas utilizando técnicas de hibridização *in situ* recém desenvolvidas que permitiram a identificação do DNA dos Papilomavírus. Este feito permitiu distinguir os vários tipos de HPV existentes, baseando-se no grau de semelhança de suas

bases nitrogenadas. Desde então, uma série de estudos sucedeu-se sobre a possibilidade de envolvimento do HPV na gênese de câncer (Oliveira *et al.*, 2003; Cavalcanti & Carestiato, 2006).

2.2 - O Agente Etiológico

Os HPVs são vírus da família *Papillomaviridae*, do gênero Papilomavírus. Esta família possui mais de 100 tipos de vírus e pode infectar várias partes do corpo (Porche, 2007). Mais de 20 tipos infectam os órgãos genitais. De acordo com o potencial oncogênico para a cérvix uterina eles podem ser classificados em HPVs de baixo, intermediário e alto risco (Reis, 2005; Boccardo & Villa, 2004) (Tabela III). Os HPVs infectam células epiteliais e são classificados como mucoepiteliotrópicos e espécie-específicos (Reis, 2005). Essas lesões podem ser de diversos tipos, como a verruga comum e a verruga genital ou condiloma, popularmente conhecida como “crista de galo” (Brown & Fife, 1990).

Tabela III. Classificação dos HPVs quanto a categoria de risco oncogênico.*Tipos virais associados a diferentes graus de lesões escamosas intraepiteliais carcinomas cervicais e pênis (Reis, 2005; Boccardo & Villa, 2004).

Risco Oncogênico	Tipo viral HPV
Inespecífico ou indeterminado	30, 34, 53, 57, 62, 64, 67 e 69.
Baixo risco	6*, 11*, 26, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 73 e 81.
Alto Risco	16*, 18*, 31*, 33*, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 66 68 e 82.

O vírus apresenta-se não envelopado, com simetria icosaédrica e um diâmetro de aproximadamente 55 nm (Hebner & Laimins, 2006). Sua partícula viral apresenta o genoma constituído de DNA de fita dupla circular, medindo entre 6.800 a 8.400 pares de bases

(Souto *et al.*, 2005). Seu capsídeo é formado por 72 subunidades protéicas, denominadas capsômeros. As proteínas estruturais são do tipo L1 (proteína maior) que é gênero-específica e L2 (proteína menor) que é altamente tipo-específica (Tyring, 2000).

O genoma é dividido em aproximadamente 8 regiões gênicas denominadas seqüências abertas de leitura, do inglês *open reading frames* (ORF) que estão localizados na mesma fita de DNA. Estas ainda podem ser funcionalmente separadas em três regiões principais: Regulatória, Precoce e Tardia (Figura 1).

A região regulatória, não codificadora, de 400 a 1.000 pares de bases que é conhecida pelas denominações, do inglês, *long control region* (LCR- longa região de controle) ou, do inglês *upstream regulatory region* (URR – região regulatória superior), está localizada entre os genes L1 e E6. Na LCR, existem seqüências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem da replicação (Souto *et al.*, 2005).

A região precoce, do inglês, E (*early*), é constituída pelas ORF E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão envolvidas na replicação viral, no controle da transcrição e na oncogênese. O gene E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular (Souto *et al.*, 2005). A função do gene E5 não é bem conhecida, parece codificar provavelmente uma proteína de membrana com atividade transformadora fraca (Leptak *et al.*, 1991). As proteínas virais E6 e E7 dos HPV's de alto risco oncogênico são as principais responsáveis pela transformação celular nas células hospedeiras dos vírus e atuam também na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (Werness *et al.*, 1990).

A região tardia, do inglês, L (*late*), é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral (Cavalcanti & Carestiato, 2006). A proteína L1 é a principal do capsídeo e a L2 é a proteína secundária (Souto *et al.*, 2005).

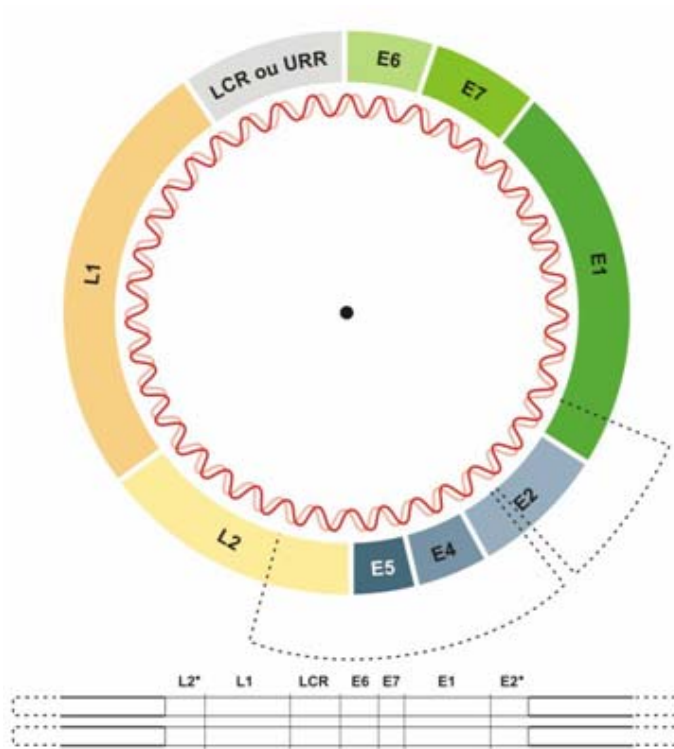


Figura 1. Organização do DNA circular do HPV e sua integração no DNA da célula hospedeira (Reis, 2005)

2.3 - Replicação viral, integração e Carcinogênese

A infecção pelo HPV ocorre nas células da camada basal do epitélio escamoso estratificado e sua replicação depende do processo de diferenciação destas células. Esse processo inicia-se com a interação de fatores celulares do hospedeiro com a região LCR do genoma do HPV (Figura 2).

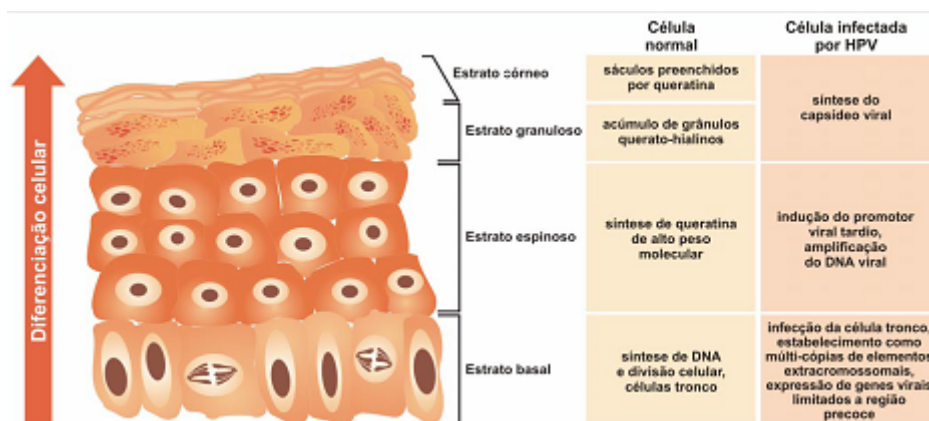


Figura 2. Esquema mostrando as funções dependentes da diferenciação em células epiteliais normais e infectadas por HPV (Silva *et al.*, 2005)

Após a infecção viral, os primeiros genes a se expressarem são os genes E1 e E2 cujos produtos estão envolvidos na replicação do genoma viral. Os genes E1 e E2 agem independentes quanto aos sítios de ligações na origem de replicação (região LCR) do vírus. Porém, poderá ocorrer a interação das proteínas E1-E2 formando um complexo multimérico que auxilia na replicação viral. O produto do gene E1, uma fosfoproteína nuclear de 68 kDa com atividade ATPase e DNA helicase, liga-se na origem de replicação do DNA viral sendo essencial para a replicação do HPV (Souto *et al.*, 2005).

O estabelecimento e a manutenção do genoma do HPV estão também associados à expressão dos genes precoces E5, E6 e E7, que codificam suas respectivas oncoproteínas. Quando se inicia a interação de fatores celulares do hospedeiro com a região LCR do genoma do HPV, dá-se início à transcrição dos genes virais E6 e E7, cujas proteínas interferem nas vias de regulação do ciclo celular e modificam o ambiente celular para facilitar a replicação do vírus dentro da célula. Isso ocorre por meio da ligação e inativação das proteínas supressoras de tumor, alteração das ciclinas celulares e quinases dependentes de ciclinas (CDK) (Fehrmann & Laimins, 2003; Kanodia *et al.*, 2007).

Durante a divisão celular, as células basais deixam a camada basal, migram para a região suprabasal e começam a se diferenciar. Os queratinócitos, por sua vez, terminam seu ciclo celular logo que são destacados do pavimento membranal; as células infectadas por HPV entram na fase S do ciclo celular uma vez atingida a camada suprabasal. A entrada na fase S resulta na amplificação de genomas virais. Paralelamente a amplificação do DNA, existe a síntese das proteínas E1 e E4 juntamente com proteínas do capsídeo (L1 e L2), resultando na formação dos viriões infectivos. Subsequentemente, os viriões são liberados ao ambiente na camada superior, quando o epitélio é descamado (Doorbar *et al.*, 1997).

A proteína codificada pelo gene E2 é um fator que regula a transcrição dos oncogenes E6 e E7. Quando ocorre a linearização do DNA circular do vírus, ocorre a perda de E2, que leva a uma super expressão de E6 e E7, responsáveis pela proliferação celular. As proteínas E2 são conservadas entre os HPVs e contêm dois domínios: 1 - domínio de ligação do DNA e dimerização da proteína, localizado na região C-terminal; e 2- domínio transativo, localizado na região amino-terminal. A ativação ou a repressão da transcrição, direcionada pela proteína E2, depende da posição e proximidade dos sítios de ligação-E2 em relação ao promotor. A ligação da E2 nos seus sítios específicos, situados na região LCR do genoma do HPV, resultam na modulação da atividade do promotor viral (Nishimura *et al.*, 2000). A E2 é uma proteína multifuncional, que pode funcionar como ativador transcricional ou repressor, que é mediado através de interações com fatores celulares específicos (TATA-proteína de ligação e AMF-1). A E2 também é importante na replicação do DNA viral. Essa proteína forma um complexo com a E1, aumentando a afinidade do produto do gene E1 de se ligar à origem de replicação viral.

O complexo E1:E2 é precursor de um grande complexo multimérico. Após a retirada da E2, ocorre a distorção da origem de replicação e o DNA é liberado para iniciar a replicação. A E2 age como um fator auxiliar que funciona na pré-iniciação do complexo na origem de replicação (Rosenblatt *et al.*, 2005).

A regulação negativa mediada por E2 sob a transcrição de E6 e E7 resulta na liberação das proteínas p53 e pRb, permitindo assim a continuação do processo de diferenciação celular normal. Em seguida, o produto do gene E5 induz o aumento da atividade de uma proteína quinase mitogênica, que aumenta a resposta celular de proliferação e diferenciação. Já o produto do gene E4 tem um papel importante na maturação e na liberação das partículas dos HPVs, pois esta proteína leva ao colapso da rede de citoqueratina, que resulta no aspecto

típico das células infectadas pelo HPV, também chamadas de coilócitos (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

A integração do DNA viral à célula é uma etapa que acelera o processo de malignidade, quando frequentemente ocorre a ruptura da região E2. Uma vez rompida a função controladora da E2, sob o promotor viral da E6 e E7, altos níveis de expressão desses genes são observados, levando à transformação celular e resultando eventualmente em câncer (Flores *et al.*, 1999).

O E6 é um dos primeiros genes expressos na infecção do HPV. É uma proteína de 150 aminoácidos que possui um papel importante na imortalização celular. A proteína E6 sozinha não é capaz de imortalizar os queratinócitos humanos primários, mas sua interação com a proteína E7 induz mudanças no comportamento celular, que resulta na imortalização das células infectadas. A proteína E6 não possui atividade enzimática intrínseca, portanto se utiliza de interações com proteínas celulares para que exerça suas funções. Uma função bastante importante da proteína E6 do vírus de alto-risco é sua ligação à proteína p53 (Liu *et al.*, 1999). Esta proteína, uma biomolécula de 53 kDa, é ser supressora do crescimento celular. Ela está associada ao controle do ciclo celular, reparo e síntese do DNA, diferenciação celular, plasticidade genômica e apoptose (Lam *et al.*, 1995; Rosenblatt *et al.*, 2005; Kanodia *et al.*, 2007).

Nos processos não produtivos, quando o DNA do HPV é integrado ao DNA da célula hospedeira, seguindo-se à integração, o produto do gene E6 liga-se com alta afinidade a p53 promovendo uma rápida degradação desta proteína via uma ubiquitina-ligase celular. Esta degradação simula o mesmo efeito da inativação resultante de mutação do gene da p53. Além disso, a degradação da p53 é também provocada pela ativação da telomerase (enzima constituída de multisubunidades responsável pela replicação do DNA telomérico nas

extremidades dos cromossomos), através das proteínas E6 dos HPVs de alto-risco (Elenbaas *et al.*, 2001).

Quando ocorrem erros no DNA, a proteína p53 interage com outras proteínas para que o DNA seja reparado. Se isto não for possível, a p53 sinaliza para proteínas reguladoras induzirem a apoptose, a fim de eliminar as células mutantes. A inativação da p53 leva à regulação repressora da ciclina B, proteína que forma um complexo com a CDK1 e apresenta um papel de fator promotor de mitose, regulando a transição de G₂ para a fase M no ciclo celular normal. Logo, a inativação da p53 resulta na perda dessas funções (Fehrmann & Laimins, 2003) (Figura 3).

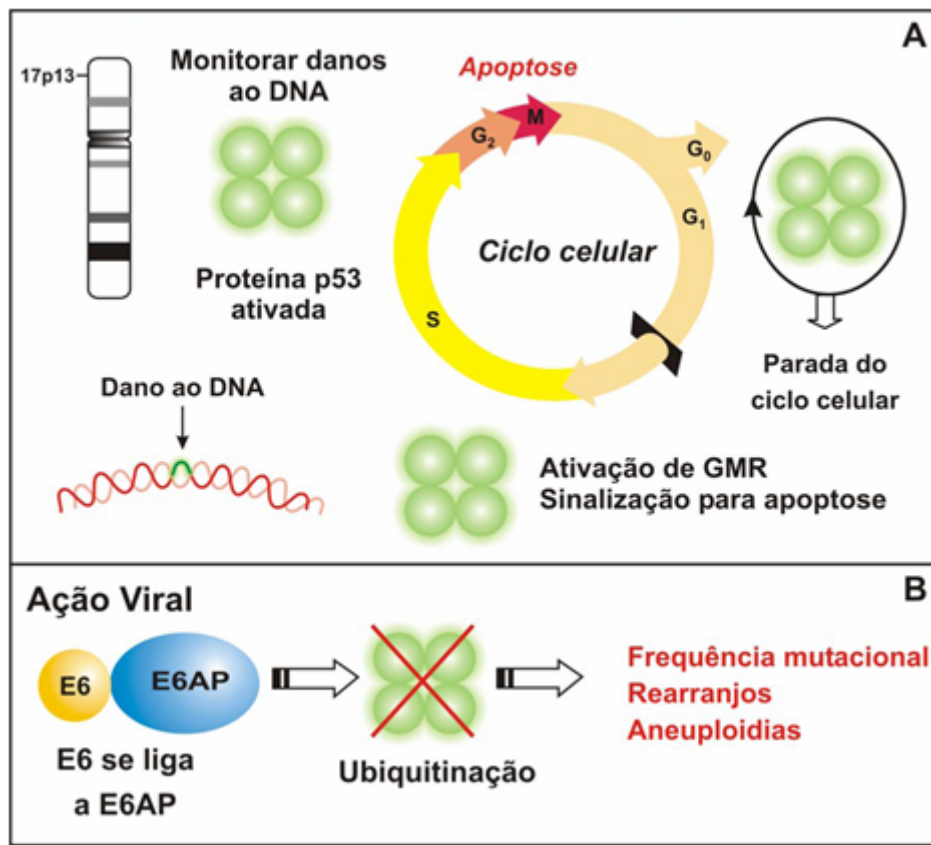


Figura 3. Ação da proteína p53 sobre o ciclo celular. **A** - A proteína p53 é codificada pelo gene p53 localizado no cromossomo 17p13. A proteína p53 tem a função de parar o ciclo celular no caso de identificação de danos ao DNA, dessa forma o ciclo para até que o dano seja resolvido. No caso de danos extensos a p53 pode induzir a apoptose. **B** - A proteína viral E6 se liga a E6AP que funciona como uma ubiquitina, degradando p53. GMR: Genes do mecanismo de reparo (Silva *et al.*, 2005).

A proteína E7 juntamente com a proteína E6, promovem a transformação dos HPVs. A expressão da E7, sozinha induz imortalização de queratinócitos humanos, porém, na presença da proteína E6 ocorre um aumento deste evento. A função principal do gene E7 dos HPVs de alto risco é desregular o ciclo celular da célula infectada. As proteínas E7 de HPVs de alto-risco são nucleares, contendo aproximadamente 100 aminoácidos e ligam-se às proteínas da família do gene do retinoblastoma (Rb – gene repressor de tumor) (Halbert *et al.*, 1991). Essa interação permite que E2F atue na ativação constitutiva dos fatores transcricionais, o que levaria à progressão do ciclo celular. E7 também forma complexos com ciclinas A e E, bem como provoca inativação de p21 e p27 (Souto *et al.*, 2005). A atividade inicial da E7 e sua associação a membros da família do gene Rb facilita a progressão do ciclo celular dentro da fase S. As proteínas Rb apresentam papel importante na regulação do ciclo celular, promovendo a transição da fase G1 a S. Em células normais, a Rb é hipofosforilada durante as fases G0 e G1 e torna-se altamente fosforilada durante as fases S, G2 e M (Halbert *et al.*, 1991).

A proteína Rb na forma hipofosforilada se liga ao fator de transcrição E2F e reprime a transcrição de promotores contendo sítios E2F. Muitos genes necessários a síntese de DNA, como a DNA polimerase e a timidina-quinase, são transcritos de uma maneira dependente do ciclo celular e regulados pelo E2F. Através da ligação da Rb hipofosforilada, a E7 impede que esta se ligue ao E2F, e, portanto, promove a continuação do ciclo celular. Isso ocorre porque, quando a E7 se liga a pRb, ela impede que essa proteína se ligue ao fator de transcrição E2F, e com E2F livre, o ciclo celular fica sem controle. Em epitélio normal, a parada do ciclo celular, ocorre através do sinal de diferenciação, que é altamente regulado pela proteína Rb. A ligação da E7 com a pRb, promove a continuação do ciclo celular de células epiteliais já

diferenciadas, permitindo a replicação de genes do HPV (Davies *et al.*, 1993; Rosenblatt *et al.*, 2005) (Figura 4).

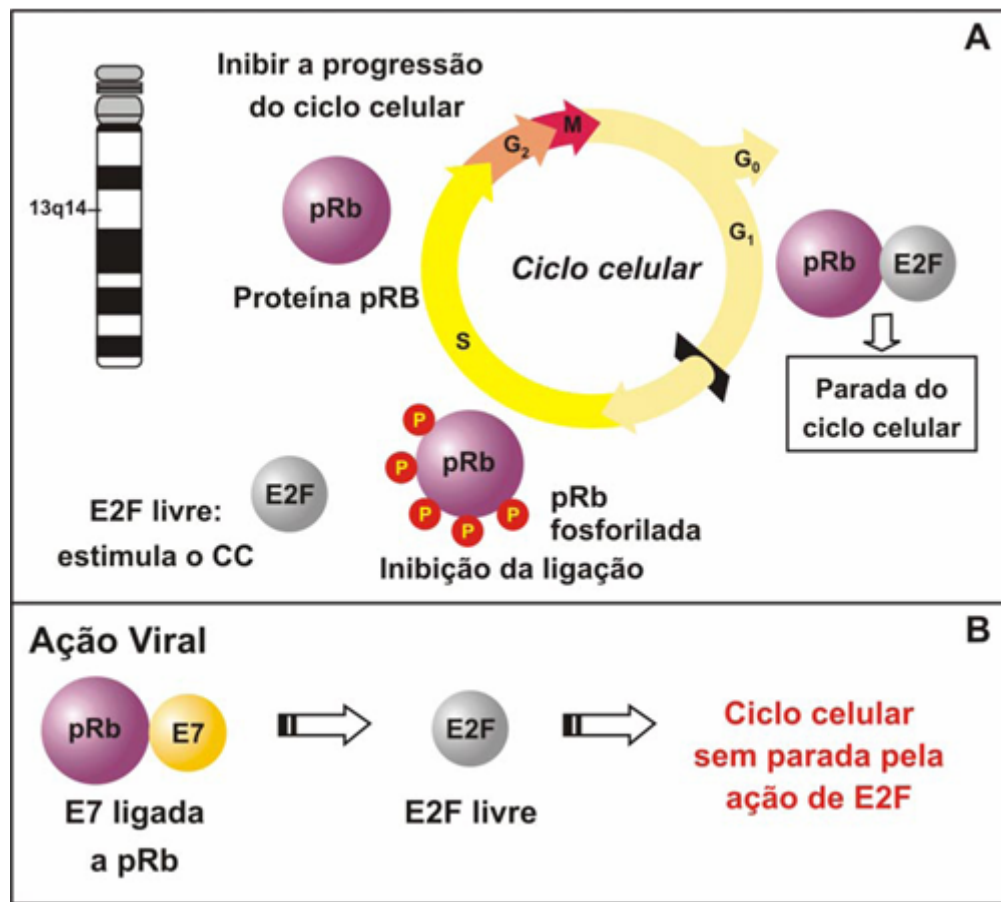


Figura 4. Ação da proteína pRb sobre o ciclo celular. **A** – A proteína pRb é codificada pelo gene RB1, localizado no cromossomo 13q14. A ligação da proteína pRb ao fator de transcrição E2F resulta na parada do ciclo celular. A fosforilação de pRb libera E2F que ativa a transcrição de genes alvo para a replicação do genoma. **B** - A proteína viral E7 se liga a proteína pRb, isso libera E2F, causando um estímulo constante para a divisão celular (Silva *et al.*, 2005).

A proteína E7 do HPV-16 pode também induzir duplicação anormal do centrômero. Embora a E6 provoque também esse efeito, a E7 induz distúrbios mitóticos relacionados aos centrômeros, por mecanismos ainda não conhecidos. Duplicações anormais do centrômero resultam na instabilidade genômica e aneuploidia. Tal atividade contribui para a progressão da malignidade em HPVs de alto-risco (Halbert *et al.*, 1991). Os HPVs 16 e 18, variantes de alto risco, promovem a ligação das proteínas E6 e E7 nos produtos dos genes supressores de tumor

p53 e pRb, respectivamente, causando degradação protéica, desregulação do ciclo celular e alteração dos mecanismos de reparo do DNA e apoptose. Estas alterações são responsáveis pelo mecanismo de malignização gerado pelo HPV (Weimberg, 2000).

A afinidade entre as proteínas derivadas dos genes supressores de tumores com as proteínas virais E6 e E7 determina o grau de oncogenicidade dos diferentes tipos de HPV, permitindo assim que alguns tipos de HPV sejam mais oncogênicos que outros, como por exemplo, os produtos dos genes E6 e E7 dos HPVs de alto risco oncogênico, que apresentam grande afinidade com as proteínas p53 e pRb, e dos HPVs de baixo risco oncogênico, que possuem baixa afinidade pelas mesmas proteínas. A integração do genoma do vírus ao genoma da célula hospedeira é um evento necessário para o processo de imortalização dos queratinócitos e, portanto, da carcinogênese (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

As células infectadas por HPV podem tornar-se imortais pela ação da proteína E6, que ativa a telomerase, e da E7, que inativa a pRb. A telomerase é uma enzima ribonucleoprotéica complexa com atividade tipo transcriptase reversa e DNA polimerase, capaz de sintetizar a partir de uma matriz de RNA, o DNA telomérico na extremidade cromossômica e é indicativa de funcionamento celular. A atividade da telomerase não é uma constante na vida da célula. Na célula somática essa enzima torna-se inativa e os telômeros sofrem erosão a cada divisão celular, diminuindo o seu comprimento, podendo sofrer senescência ou apoptose. Nas células germinativas, essa enzima se mantém ativa devido à constante proliferação destas células. Acredita-se que a imortalização da célula seja uma etapa crucial no desenvolvimento de tumores malignos e que a atividade da telomerase possa estar relacionada a essa fase, pelo fato das células neoplásicas reativarem intensamente a atividade dessa enzima (Griffiths & Mellon, 1999).

Porém, mesmo com a imortalização das células infectadas pelo HPV através da ação das proteínas E6 e E7, essas células ainda não são consideradas tumorigênicas. Para que essa condição se estabeleça é necessário que mutações adicionais ocorram nessas células para que possa haver a progressão maligna. Portanto, além da indução da carcinogênese pelas próprias proteínas do HPV que facilitam a aquisição das mutações, para formação do tumor, é necessária a interação de fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e imunológicos (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

2.4 - O HPV e o câncer de Pênis

Histologicamente, o câncer de pênis apresenta características semelhantes a outros carcinomas epidermóides de outras áreas do corpo, demonstrando, normalmente, tumores bem ou moderadamente diferenciados, com perda da diferenciação das células da camada basal em direção à camada apical, com núcleos celulares hipercromáticos e com tamanhos variáveis (Pompeo e Gil, 2005; Mostofi *et al.*, 1973).

Os tumores de pênis podem ser classificados em diferentes tipos baseando em suas características histopatológicas e formas de apresentação. Eles podem ser: carcinoma epidermóide (mais comum), carcinoma basalóide, carcinoma verrucoso, carcinoma sarcomatoso, carcinoma epidermóide da variante verrucosa e carcinoma papilar (Pompeo e Gil, 2005).

O tipo histológico mais freqüente de câncer de pênis é o carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso (CEC) que representa 95% dos tumores malignos do pênis. O carcinoma verrucoso é uma variante do CEC de câncer de pênis, de comportamento clínico menos agressivo. De modo adverso à tendência infiltrativa e ulcerada do CEC, o carcinoma verrucoso constitui uma lesão vegetante, de crescimento lento e com

menor potencial de metastatização. Outros tipos histológicos mais raros incluem o carcinoma baso-celular, sarcoma de Kaposi, melanoma e linfoma. A eritroplasia de Queyrat e a doença de Bowen eram erroneamente citadas como lesões pré-malignas. Na verdade ambas as lesões são malignas, porém não invasivas. Hoje apenas a neoplasia intra-epitelial peniana (NIP) de alto grau é considerada como pré-maligna (de Paula *et al.* 2005).

A relação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço e de colo de útero já foi comprovada (IARC, 1995). O papel do HPV na gênese do carcinoma de pênis também vem sendo investigado (Prowse *et al.*, 2008; Maden *et al.*, 1993). Em especial a transformação maligna do condiloma acuminado já foi descrita por vários autores (Boxer & Skinner, 1977; Malek, 1992; Barrasco *et al.*, 1987; Iversen *et al.*, 1997; Beggs & Spratt, 1964; Dawson *et al.*, 1965).

A presença do genoma viral tem sido descrita em 15-80% dos casos de câncer de pênis (Griffiths & Mellon, 1999). Os tipos virais 16 e 18 de alto risco oncogênico, são os mais freqüentemente encontrados em lesões neoplásicas que acometem o pênis (Levi *et al.*, 1998; Picconi *et al.*, 2000). Evidências sugerem que pacientes infectados com os tipos virais 16, 18, 31 e 33 possam ter uma predisposição para o desenvolvimento do carcinoma escamoso de pênis e, portanto, as infecções causadas por esses tipos virais são consideradas como fatores de maior risco oncogênico (Reis, 2005; Gil *et al.*, 2001).

No Brasil, McCance *et al.*, 1986 e Villa, 1997, utilizando a técnica de *Southern blotting*, identificaram DNA de HPV em 44,4% (8/18) e 50,9% (27/53) dos casos de carcinoma de pênis, respectivamente. Nos dois estudos o tipo 16 foi o mais freqüentemente encontrado nos pacientes positivos para o vírus.

Sarkar *et al.*, 1992 estudaram pela técnica de *Southern blotting*, 11 pacientes com carcinoma invasivo de pênis e detectaram a presença de HPV associado ao genoma das

células tumorais em 81,8% (9/11) dos casos. O tipo 16 foi o mais predominante. Da mesma forma, o genoma de HPV 16 foi obtido em 100% dos pacientes com carcinoma *in situ*. Um paciente apresentou carcinoma verrucoso, para o qual não foi detectado nenhum tipo viral associado à lesão.

Em 1995 Gregoire *et al.*, em um estudo envolvendo 117 pacientes com câncer de pênis, detectaram o DNA de HPV por reação de cadeia da polimerase (PCR) em 22,2% dos casos. A associação do DNA viral foi observada em 75% dos carcinomas basalóides e em apenas 11,1% dos carcinomas escamosos típicos. O genótipo de HPV mais freqüentemente associado aos carcinomas penianos foi o 16.

Em 2000 Picconi *et al.*, realizaram, na Argentina, um estudo retrospectivo com 38 homens com carcinoma de células escamosas, Eles utilizaram a técnica de PCR para detecção e genotipagem do DNA do HPV. O DNA do HPV foi encontrado em 71% dos casos. Destes 71% positivos para o genoma do HPV, 81% eram subtipos de HPV de alto risco, com predominância do HPV18. Em 3 pacientes o HPV 16 foi detectado não só nos tumores primários e metástases como também em linfonodos histologicamente normais. Segundo os autores, os dados indicam que a maior parte dos pacientes com carcinoma peniano na Argentina apresentam etiologia relacionada ao HPV, principalmente os de alto risco.

Bezerra *et al.*, 2001 reviram trabalhos publicados e encontraram que, pela técnica de PCR, a presença de HPV em carcinoma peniano, variou de 30 a 100% dos casos. Já Castellsagué *et al.*, 2002, detectaram DNA de HPV em 182 dos 1139 (16%) espécimes de biópsias penianas. O tipo viral mais comumente encontrado foi o 16. Este tipo viral esteve presente em 24,7% das amostras positivas para o genoma do HPV. Os HPVs 18, 6, 11, 53, 31, e 33 estiveram presentes em 4,9%, 3,3%, 3,3%, 3,3%, 2,7% e 2,2% respectivamente.

O HPV foi detectado em 19,6% (166/847) dos homens não circuncidados e em 5,5% (16/292) dos homens circuncidados.

Um trabalho de Wang *et al.*, 2003, detectou presença de DNA do HPV utilizando a técnica de PCR em um estudo com 51 pacientes com carcinoma de células escamosas, 40 pacientes com papulomatose bowenóide, 5 pacientes com doença de bowen e 6 pacientes com Erythroplasia de Queyrat . O genoma do HPV foi encontrado em todos os casos de carcinoma de células escamosas e o HPV16 foi, mais uma vez, o tipo viral mais encontrado, correspondendo a 56,9% (29/51) dos casos. O DNA do HPV foi detectado em 55% (22/40) dos casos de papulomatose bowenóide. Destes, 90,9% (20/22) eram HPV16, 4,5% (1/22) eram HPV 31 e 4,5% (1/22) eram casos de co-infecção entre o HPV6 e o HPV 16. O genoma do HPV foi encontrado em todos os 5 casos de doença de bowen. Destes, 80% (4/5) eram do subtipo viral 16 e 20% (1/5) apresentavam co-infecção entre o HPV6 e o HPV 16. O DNA do HPV também esteve presente em 33,3% (2/6) dos casos de pacientes com Erythroplasia de Queyrat e todos os 33,3% eram do subtipo 16.

Em 2005 Daling *et al.*, conduziram estudos no Estado de Washington que incluíram 137 homens com diagnóstico de carcinoma peniano. Dentre estes 137 pacientes o DNA do HPV foi detectado, por PCR, em 79,8% dos espécimes de tumor. Destes 79,8% positivos para o genoma do HPV, 69,1% eram HPV 16.

Senba *et al.*, 2006, utilizaram as técnicas de Hibridização “in situ” e PCR para detecção e genotipagem de HPV em 88 espécimes de tecido peniano de pacientes no norte da Tailândia. Destas 88 amostras, 65 apresentavam lesões malignas, 1 apresentava lesões pré-malignas e 22 apresentavam lesões benignas. O DNA do HPV foi detectado em 53,8% e 81,5% dos casos de câncer de pênis, usando Hibridização “in situ” e PCR, respectivamente. O HPV 16 geralmente é o tipo viral mais comumente associado ao câncer de pênis. Portanto,

nesse estudo, ele foi detectado em apenas 1 dos casos. O tipo viral mais prevalente foi o HPV 18, sendo encontrado em 55,4% dos casos, seguido pelo HPV 6 em 43,1% dos casos.

Pascual *et al.*, em 2007, estudaram 49 pacientes com câncer de pênis. A detecção de HPV nas amostras foi realizada com a técnica de PCR, utilizando-se os conjuntos de *primers* MY9/11 e GP5+/6+. O genoma do HPV foi encontrado em 77,5% (38/49) dos casos. O HPV 16 esteve presente em 84,2% (32/38) dos casos positivos e o HPV 18 em 10,5% (4/38). Também em 2007, Heideman *et al.*, encontraram DNA de HPV em 55% (46/83) dos casos de carcinoma de células escamosas estudadas pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). O HPV 16 foi o tipo viral mais prevalente, sendo encontrado em 52% (24/46) dos casos positivos para o genoma do HPV.

Prowse *et al.*, em 2008, estudaram 46 pacientes pela técnica de PCR e encontraram DNA de HPV em 54% dos carcinomas de células escamosas. O HPV 16 de alto risco foi o tipo viral mais encontrado. Neste mesmo ano, Tornesello *et al.*, estudaram biópsias de 41 pacientes com câncer de pênis e detectaram, pela técnica de PCR, o genoma do HPV em 46,3% (19/41) dos casos. Os subtipos virais encontrados foram o HPV 16 e o HPV18, sendo o HPV 16 o mais prevalente (94,7% - 18/19). Na Tabela IV se encontra o resumo da prevalência de HPV nestes diferentes estudos.

O índice de associação do carcinoma de pênis com a infecção pelo HPV varia de acordo com a técnica utilizada para a detecção do vírus, uma vez que algumas técnicas podem ser mais sensíveis ou específicas. Em geral, o genoma do HPV é encontrado em aproximadamente 5% a 11% dos casos avaliados pela hibridização *in situ*, 25 a 51% quando se usa a técnica de *Southern blotting* e em até 82% dos casos avaliados por PCR. O isolamento de DNA total de amostras biológicas frescas favorece a identificação do genoma do vírus em relação a amostras fixadas com formol (Le Moal & Thierry, 1995).

Tabela IV. Prevalência de HPV em câncer de pênis em diferentes estudos

Pesquisadores	Ano	Técnica	Nº de casos	Percentual de HPV	Tipo viral prevalente
McCance <i>et al.</i>	1986	Southern blotting	18	44,40%	HPV 16
Sarkar <i>et al.</i>	1992	Southern blotting	11	81,80%	HPV 16
Gregoire <i>et al.</i>	1995	PCR	117	22,20%	HPV 16
Villa	1997	Southern blotting	53	50,90%	HPV 16
Picconi <i>et al.</i>	2000	PCR	38	71%	HPV18
Bezerra <i>et al.</i>	2001	PCR	Artigo de revisão	Variação de 30 a 100%	----
Castellsagué <i>et al.</i>	2002	PCR	1139	16%	HPV 16
Wang <i>et al.</i>	2003	PCR	51 – CEC 40 - papul. bowen. 5 - doença de bowen 6 - Erythroplasia de Queyrat	100% 55% 100% 33,3%	HPV 16
Daling <i>et al.</i>	2005	PCR	137	79,8%	HPV16
Senba <i>et al.</i>	2006	Hibridização “in situ” PCR	88	53,8% 81,5%	HPV18
Pascual <i>et al.</i>	2007	PCR	49	77,5%	HPV16
Heideman <i>et al.</i>	2007	RT-PCR	83	55%	HPV16
Prowse <i>et al.</i>	2008	PCR	46	54%	HPV 16
Tornesello <i>et al.</i>	2008	PCR	41	46,3%	HPV16

O progresso no entendimento da etiologia, patogênese e o prognóstico mais acurado dos tumores malignos de pênis, têm sido lento devido à carência de estudos moleculares que investiguem as prováveis alterações genéticas, aspectos clínicos e agentes biológicos como o HPV, associados ao desenvolvimento e progressão dessa neoplasia. Por isso, foi proposto verificar a associação entre o HPV e os tumores de pênis.

A presença de fimose, nos portadores de câncer de pênis, é considerada como um fator facilitador da infecção pelo HPV e de sua persistência na região, aumentando assim o risco de ocorrência da doença (de Paula *et al.* 2005), portanto, é importante esclarecer a população no sentido da prevenção do câncer de pênis, para podermos proporcionar uma redução da incidência e da severidade da doença a fim de evitarmos os tratamentos agressivos.

Apesar da incidência relativamente baixa do câncer peniano, a anatomia e a fisiologia do órgão favorecem a persistência de HPV na região e facilita a veiculação do vírus entre os parceiros. A falta de informação e conhecimento acerca do papel do HPV na carcinogênese do epitélio peniano justifica o presente estudo, para corroborar os resultados dos estudos relacionados na Tabela IV. Adicionalmente, a proposta do presente estudo consistiu em um subprojeto integrante de outros projetos de pesquisa conduzidos pela equipe do NPR em parceria com o serviço de Urologia do HAJ/ACCG.

3. Objetivos

3.1 – Objetivo Geral

- Detectar e genotipar HPV em espécimes biológicos de tumor de pênis diagnosticados no Serviço de Urologia do Hospital Araújo Jorge (HAJ).

3.2 – Objetivos Específicos

- Detectar a prevalência do HPV em tumores penianos e genotipar por PCR os tipos virais encontrados;
- Determinar as possíveis associações existentes entre a presença viral e os aspectos clínico - patológicos descritos nos prontuários individuais para os tumores;
- Correlacionar com outros aspectos clínicos relevantes observados no câncer de pênis com presença de HPV no caso;
- Contribuir para a geração de conhecimentos e formação de pessoal qualificado, visando ao desenvolvimento científico e tecnológico regional.

4. Material e Métodos

4.1 – Aspectos Éticos

O presente estudo foi realizado, no Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás (NPR-UCG), após a apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás – CEP/ACCG (Anexo 1).

4.2 – População de casos

Foi realizado um estudo prospectivo no Serviço de Urologia do Hospital Araújo Jorge (SU-HAJ) com 29 amostras de tecido tumoral de pacientes com carcinoma peniano congeladas, oriundas do período de 2001 a 2006.

O critério de inclusão para o estudo foi a presença de carcinoma peniano. Como critério de exclusão foi definido comprometimento da região genital ou outra topografia por tumores de outra origem.

Os dados relativos aos pacientes incluíram nome e idade à época do diagnóstico, presença ou ausência de fimose. As características tumorais, como tipo histológico, tamanho do tumor, estadiamento, tipo de tratamento e topografia, e os hábitos de vida, como o tabagismo e o etilismo, foram colhidos e registrados diretamente dos prontuários dos respectivos pacientes (Anexo 2).

4.3 – Amostras

As 29 amostras de carcinoma peniano foram colhidas e congeladas no período de 2001 a 2006. Essas amostras foram encaminhadas ao NPR-UCG e conservadas a -80°C.

4.4 – Extração de DNA das amostras

A extração de DNA genômico das amostras foi realizada com a utilização do kit de purificação Wizard® Genomic (Promega Corporation, EUA), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante (Anexo 3). As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20° C para serem utilizadas posteriormente nas reações de PCR.

4.5 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para confirmação da presença de DNA após a extração, foi realizada uma PCR com o conjunto de *primers* para o gene da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), como controle positivo para confirmar a presença e amplificação de DNA nas amostras. Este conjunto de *primers* amplificam uma região de 99pb (Tabela V). Os protocolos da termociclagem encontram-se no Anexo 4.

Para detecção de genoma de HPV foi utilizado o conjunto de *primers* genéricos GP5+/6+, que amplificam a região L1 do capsídio viral. Embora o produto amplificado a partir de GP5+/6+ seja relativamente pequeno, atingindo cerca de 150 pb (Tabela V), a variação da seqüência nucleotídica deste fragmento é grande o suficiente para a discriminação dos tipos de HPV após o seqüenciamento (Boon, *et al.*, 1988). Os protocolos para a execução das reações de PCR para detecção de HPV foram otimizados a partir dos protocolos sugeridos na literatura (Gravitt *et al.*, 2000; Reis, 2005) e encontram-se descritos no Anexo 4.

Após a detecção genérica de DNA do HPV, as amostras foram genotipadas usando-se os conjuntos de *primers tipo-específicos* para genotipar os HPVs 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45, e 58 (Karlsen *et al.*, 1996). Os iniciadores para a amplificação tipo-específica foram escolhidos de acordo com a prevalência dos HPVs em infecções genitais, conforme divulgado na literatura (zur Hausen, 2002). Os tamanhos dos fragmentos em pares de base,

correspondendo aos seus pesos moleculares, amplificados pelos *primers* tipo-específicos e as seqüências de oligonucleotídeos de cada *primer* estão indicados na Tabela V. Os protocolos para a execução das reações de PCR para a genotipagem do DNA viral foram otimizados a partir dos protocolos sugeridos na literatura (Reis, 2005), e encontram-se descritos no Anexo 4.

Tabela V. Seqüências dos *primers* utilizados para confirmar a positividade da extração de DNA (GAPDH), para detecção (GP5+/6+) e genotipagem de HPV, mostrando o tamanho do fragmento

Tipos	S*	Seqüências 5' → 3'	Fragmento (pb)
HPV 6	F	CAC GTC TGC AAC GAC CAT AG	195
	R	CCA TGA AAT TCT AGG CAG CA	
HPV 11	F	CGC AGA GAT ATA TGC ATA TGC	90
	R	AGT TCT AAG CAA CAG GCA CAC	
HPV 16	F	TCA AAG CCA CTG TGT CCT GA	119
	R	CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA	
HPV 18	F	CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT	172
	R	TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT	
HPV 33	F	AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG	211
	R	ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG	
HPV 35	F	CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA	230
	R	GGG GCA CAC TAT TCC AAA TG	
HPV 45	F	ACC AGA TTT GTG CAC AGA AT	236
	R	TTT TTT CCA GTG TCT CTC CA	
HPV 58	F	GGA CAT TGC ATG ATT TGT GT	314
	R	TTT CTT GTG GAC ACA ATG GT	
GAPDH	F	CAG TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG	99
	R	TTG TCA TCA ATG GAA ATC CCA TCA	
GP 05+	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	150
GP 06+	R	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	

*S: Sentido - F: Forward (Senso) e R: Reverso (Anti-senso).

Todas as reações foram realizadas dentro da capela devidamente limpa, com todos os materiais previamente autoclavados e ponteiros e luvas descartáveis.

Foram tomados todos os cuidados para se evitar contaminação.

4.6 – Eletroforese

Os produtos de PCR foram analisados a partir da separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 8% (Anexo 5). Em cada canaleta foram aplicados cerca de 5 μ L do produto de PCR misturados com 2 μ L do tampão de corrida Azul de Bromofenol a 0,25% (Anexo 5).

O marcador molecular utilizado foi o marcador da *Epigem* a uma diluição de 1/4. Posteriormente, os géis foram submetidos a uma voltagem de 10V/cm em um campo elétrico uniforme. Após a corrida eletroforética, o gel contendo os amplicons de DNA foi corado em solução de nitrato de prata (Anexo 6). A imagem do gel foi capturada por uma câmera digital para a análise dos amplicons.

5. Resultados

Foram avaliadas biópsias tumorais de 29 pacientes, com idade entre 26 e 89 anos, portadores de carcinoma peniano. Não foi possível coletar dados de quatro pacientes devido, os respectivos prontuários não estarem disponíveis no Serviço de Arquivo do Hospital Araújo Jorge (SA-HAJ). Portanto, as análises dos dados referentes aos aspectos clínicos-patológicos dos pacientes como, o tipo histológico, tamanho do tumor, estadiamento e outros, foram realizadas com os prontuários disponíveis, correspondendo a um total de 25. E as análises das reações moleculares foram realizadas com o número total de pacientes (29), uma vez que todos foram submetidos às PCRs.

A média das idades dos pacientes que compõem o grupo de estudo foi de 61,5 anos. A frequência percentual da distribuição dos carcinomas estudados por topografia foi de 24% (6/25) na haste, 28% (7/25) na glande, 16% (4/25) na glande e prepúcio, 12% (3/25) na glande e haste, 8% (2/25) no prepúcio e 12% (3/25) para outras especificações (Figura 5).

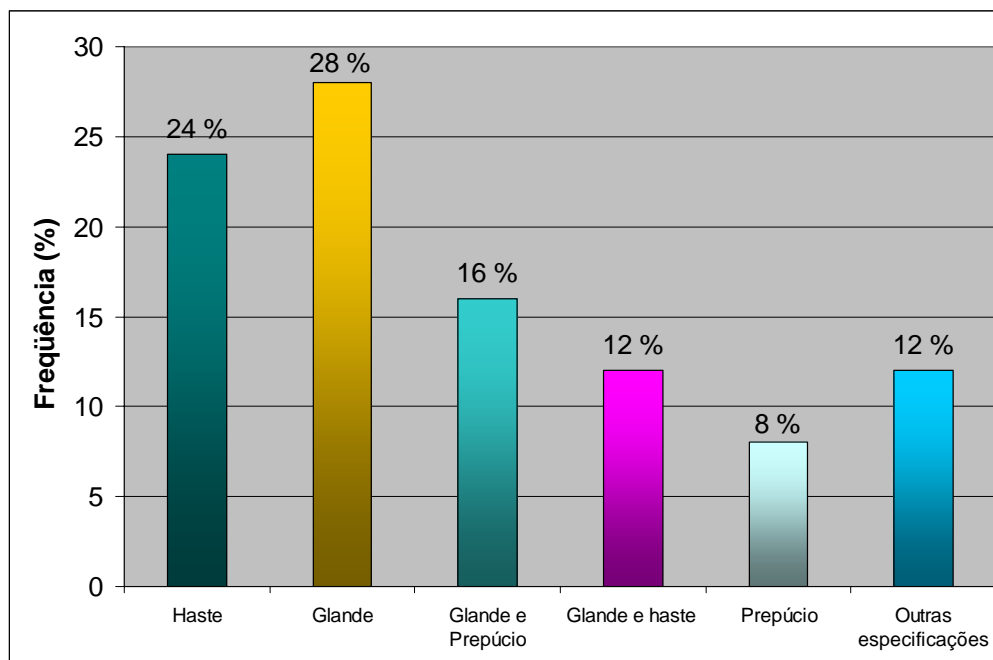


Figura 5. Frequência percentual da distribuição por topografia dos carcinomas estudados

Em relação aos aspectos clínico-patológicos, o tipo de lesão mais frequentemente encontrada foi a ulcerada, e a morfologia de maior prevalência foi o carcinoma escamoso invasor, variando do grau I ao IV. Sendo que os casos apresentaram 40% (4/10) para o Grau I, 30% (3/10) para o Grau II e 10% (1/10) para o Grau III / IV. No entanto, em 20% (2/10) dos pacientes analisados não obtivemos a informação para morfologia (Tabela VI).

Tabela VI. Descrição dos aspectos clínico-patológicos dos pacientes com tumores de pênis, segundo tipo de lesão e morfologia dos tumores.

Tipo de lesão	Morfologia
Lesão ulcerada	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I
Massa vegetante e ulcerada	Carcinoma Escamoso invasor Grau II
Lesão vegetante	Carcinoma Escamoso Grau I
Lesão vegetante e infiltrativa	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I
Lesão endurecida e infiltrativa com ulceração e fístula	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II
Lesão vegetante	Carcinoma Escamoso Invasor grau III / IV
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
Lesão ulcerada	Carcinoma Epidermoide bem diferenciado Grau I invasivo
Lesão ulcero - infiltrante em todo o órgão	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II
Lesões vegetantes	Carcinoma Escamoso Grau I bem diferenciado
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
Lesão úlcero-infiltrativa	Carcinoma Escamoso Grau I bem diferenciado
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
Lesão vegetante com área ulcerada	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I
Lesão ulcero vegetante	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I
Lesão ulcero vegetante	Carcinoma Verrucoso invasor Grau I
Lesões endurecidas	Carcinoma Espinocelular Grau II
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
Lesão ulcero-vegetante	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II
Lesão ulcero-vegetante	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I
Extensa lesão ulcero - infiltrante	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II
Lesão infiltrante e necrose em bordas	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II
Lesões vegetantes e nódulo endurecido na glândula	Carcinoma Escamoso Grau II moderadamente diferenciado
Lesão ulcerosa	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I
Lesão ulcero - vegetante	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I bem diferenciado

Lesão infiltrativa	Carcinoma escamoso grau II
<i>DNE</i>	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I
Lesão ulcero-infiltrativa	Carcinoma Escamoso Grau II
Lesão ulcerativa	Carcinoma Espinocelular invasor Grau II

* Destacados em verde: amostras positivas para o genoma do HPV

Para o estadiamento pela classificação de Jackson (1966), foi observada, em todos os casos, uma distribuição de 32% (8/25), 36% (9/25), 24% (6/25) e 8% (2/25) para os estágios de Jackson I, II, III e IV, respectivamente (Figura 6).

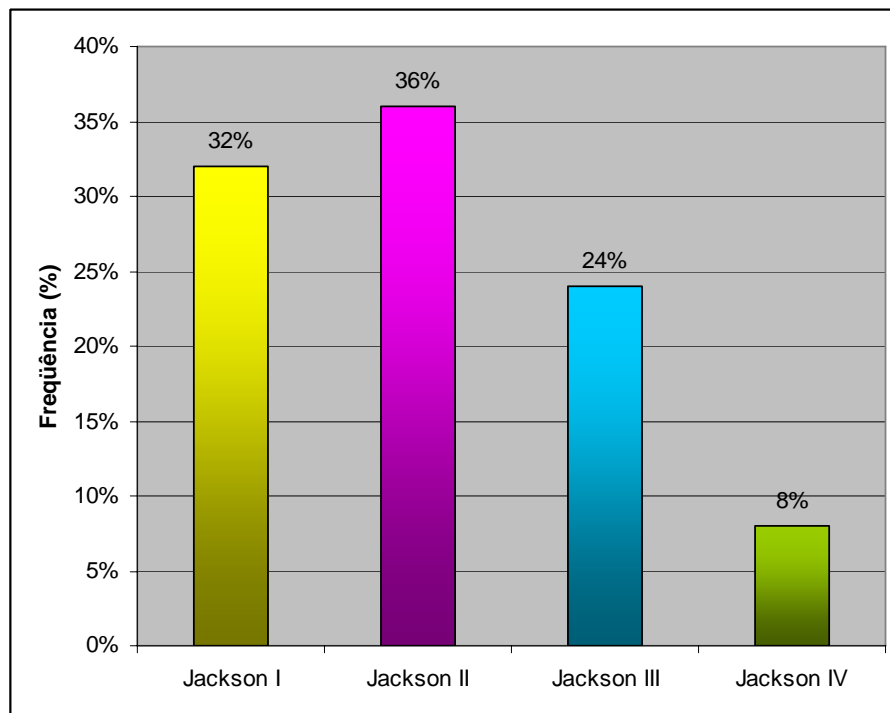


Figura 6. Frequência percentual da distribuição dos carcinomas estudados por estadiamento pela classificação de Jackson

Em relação aos hábitos de vida, 20% (5/25) dos casos eram fumantes, 4% (1/25) etilistas, 12% (3/25) fumantes e etilistas e 20% (5/25) eram ex-fumantes ou ex-etilistas. Dos pacientes, 72% (18/25) apresentaram fimose (Tabela II), 32% (8/25) apresentaram metástases e 8% (2/25) tinham histórico anterior de DST. Em 72% (18/25) dos casos o tratamento de escolha

foi a amputação parcial e em 20% (5/25) dos casos os pacientes foram submetidos a amputação total (Tabela VII).

Tabela VII. Descrição dos aspectos clínico-patológicos dos pacientes com tumores de pênis, segundo hábitos de vida, fimose e tipo de tratamento

Hábitos de vida	Fimose	Tipo de tratamento
<i>DNE</i>	presente	Amputação parcial
ex- fumante	presente	Amputação parcial com linfadenectomia
fumante e etilista	presente	Amputação parcial
<i>DNE</i>	presente	Amputação parcial
<i>DNE</i>	presente	Amputação parcial e linfadenectomia
fumante	presente	Amputação parcial
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	Amputação parcial
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	Penectomia total e emasculação
<i>DNE</i>	presente	Penectomia total
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
fumante	ausente	Amputação parcial
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
fumante e etilista	presente	Amputação parcial
fumante e ex-etilista	presente	Amputação parcial
fumante e ex- etilista	presente	Amputação parcial
<i>DNE</i>	presente	Amputação total com linfadenectomia
<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
fumante e etilista	presente	Amputação parcial
<i>DNE</i>	presente	Amputação parcial
<i>DNE</i>	presente	Amputação quase total
etilista	presente	Amputação parcial
etilista e ex-fumante	ausente	Excisão e ressecção local
<i>DNE</i>	presente	Amputação parcial e linfadenectomia inguinal
fumante	presente	Amputação parcial com esvaziamento inguinal
fumante	ausente	Amputação parcial
fumante	presente	Amputação total com uretostomia perineal
<i>DNE</i>	ausente	Amputação parcial com esvaziamento inguinal
ex- etilista	<i>DNE</i>	Amputação total com linfadenectomia

* Destacados em verde: amostras positivas para o genoma do HPV

A figura 7 contém os amplicons de algumas amostras, mostrando a eficácia na extração de DNA.

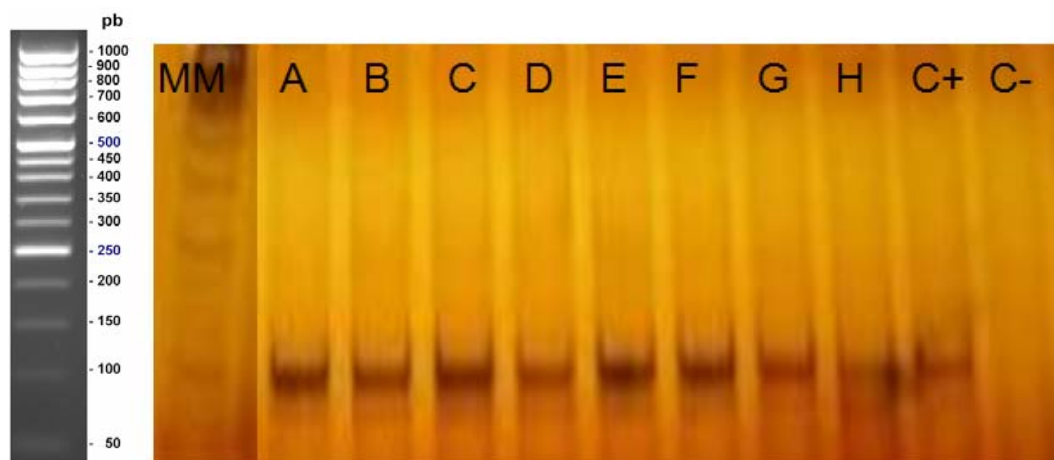


Figura 7. Gel de poliacrilamida a 8% corado com Nitrato de Prata, contendo alguns dos produtos de amplificação, utilizando o conjunto de *primers* GAPDH, para confirmar a presença de DNA após a extração. Controle positivo: amostra conhecida testada anteriormente. Controle negativo: H₂O MiliQ. Marcador molecular: marcador da *Epigem* com tamanho de 50 pb. GAPDH: 99pb

Após a confirmação da presença de DNA nas amostras, foi realizada a PCR para amplificação do genoma viral com o *primer* GP5+/6+. O DNA do HPV foi detectado em 34,5% (10/29) dos casos. As reações foram realizadas em triplicatas para confirmar o resultado obtido para cada caso (Figura 8-A).

Para as amostras positivas para o DNA do HPV, procedeu-se, mediante PCR, a genotipagem para os tipos virais 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58. Todos os resultados foram confirmados em duplicata e, quando necessário, em triplicata. O genoma do HPV 6 foi amplificado em 20% (2/10) de amostras, o do HPV 11 em 30% (3/10) e do HPV 18 em 30% (3/10). Por outro lado, genoma do HPV 16 foi detectado em 100% (10/10) das amostras com GP5+/6+ positivas (Figura 8-B). Já o HPV 33 foi detectado em 10% (1/10) das amostras, o HPV 35 em 30% (3/10), e os HPVs 45 e 58 não foram encontrados (Tabela VIII).

Tabela VIII. Prevalência dos tipos de HPV genotipados com os *primers* tipo-específicos

Tipos virais	HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	HPV 33	HPV 35	HPV 45	HPV 58
Percentual (%)	20	30	100	30	10	30	0	0

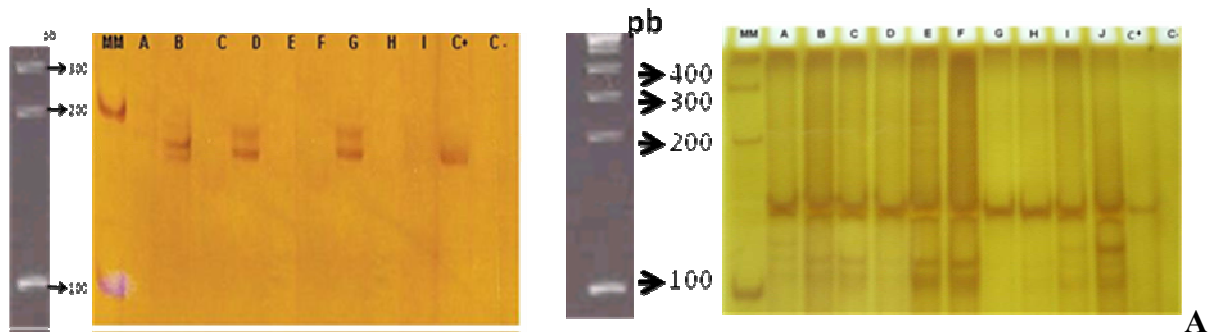
**B**

Figura 8-A: Gel de poliacrilamida a 8% corado com Nitrato de Prata, contendo produtos de amplificação para detecção de HPV utilizando o *primer* genérico GP5+/6+. Controle positivo: amostra de HPV 16 genotipada anteriormente. Controle negativo: H₂O MiliQ. Marcador molecular *Epigem* de tamanho de 100 pb. GP5+/6+: 150pb. Pacientes B, D e G positivos.

8-B: Gel de poliacrilamida a 8% corado com Nitrato de Prata, contendo os produtos de PCR para genotipagem de HPV utilizando o *primer* tipo específico HPV 16. Controle positivo: amostra de HPV 16 genotipada anteriormente. Controle negativo: H₂O MiliQ. Marcador molecular *Epigem* de tamanho de 100 pb. Tamanho do fragmento do HPV 16 – 119pb.

Dos pacientes com HPV positivos, verificamos a presença de co-infecção em 60% (6/10) dos casos, sendo que os HPVs 6 e 11 apresentaram frequência percentual em 20% (2/10) e 30% (3/10), respectivamente. E os tipos virais de alto risco oncogênico variaram conforme tabela IX.

Tabela IX. Presença de co-infecção nos pacientes com HPV positivos detectados com o conjunto de *primers* GP5+/6+

n	HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	HPV 33	HPV 35	HPV 45	HPV 58
1	-	-	+	-	-	+	-	-
2	-	+	+	-	+	-	-	-
3	-	-	+	-	-	-	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-	-
5	-	+	+	+	-	-	-	-
6	-	+	+	+	-	+	-	-
7	-	-	+	-	-	-	-	-
8	+	-	+	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	-	-	-	-

Os pacientes com amplificação positiva para GP5+/6+ apresentaram para topografia em sua maioria 40% (4/10) para glande, sendo que para o prepúcio, a haste, e glande e prepúcio o percentual foi mesmo, 10% (1/10). No entanto, 30% dos casos dos pacientes não tinham prontuários disponíveis, não sendo possível determinar a topografia.

Em relação ao Estadiamento pela Classificação de Jackson (1966) os pacientes que apresentaram presença para o HPV, não apresentaram Jackson IV. Sendo que o estadiamento de Jackson variou do Grau I ao III. O principal fator de risco foi encontrado em 70% (7/10) dos casos positivos para o HPV. No entanto, 10% (1/10) não apresentaram presença de fimose e 20% (2/10) não tinham esta informação.

Para o tratamento de escolha, todos os pacientes com detecção positiva para o agente viral foram submetidos a penectomia parcial. Entretanto, nos 29 pacientes analisados, verificou-se que mesmo os que não apresentaram amplificação para o HPV tiveram como tratamento de escolha a penectomia.

6. Discussão

O presente estudo teve como objetivo detectar e genotipar o HPV em 29 pacientes com carcinoma peniano. A faixa etária de maior prevalência para os tumores penianos foi entre a sexta e sétima décadas de vida, o que corrobora com os dados da literatura (Micali *et al.*, 2006; Reis, 2005; Lont *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2001).

A glândula demonstrou ser a topografia mais acometida, tanto nos casos totais quanto nos pacientes com HPV positivo e, segundo Young e colaboradores (2000) quando a localização é na glândula e superficial, a tendência do tumor é invadir o córion e, progressivamente, o corpo cavernoso e a uretra. Já os de origem prepucial infiltram a lâmina própria e pele e por serem em geral superficiais e mais diferenciados, tendem a ser menos agressivos.

Em todos os pacientes, a morfologia foi para o carcinoma escamoso. Segundo alguns autores, 95% a 97% dos casos de tumores malignos do pênis são representados pelo carcinoma epidermóide, também denominado espinocelular ou escamoso (De Paula *et al.*, 2005; Lamberti *et al.*, 1990).

No estadiamento com classificação de Jackson (1966) foi encontrado Jackson II em 36% dos casos totais e Jackson I em 40% dos casos de pacientes com HPV positivos. Existe grande dificuldade de padronização e aplicação clínica do estadiamento no câncer de pênis. O estágio leva em consideração o tamanho da lesão no pênis, além do status linfonodal e presença ou não de metástases à distância. O grande problema é que o TNM é essencialmente um estágio patológico, uma vez que é impossível determinar clinicamente e com grande acurácia o nível de invasão tumoral e o real status linfonodal (De Paula, 2005). Embora, o modelo de Jackson, que é o mais antigo e mais utilizado, apresente também dificuldades de padronização (Pompeo e Gil, 2005).

Em 32% (8/25) dos pacientes houve presença de metástases, e destes 24% (6/25) tiveram comprometimento dos linfonodos. O acometimento de mais de dois linfonodos inguinais reflete um maior risco de recidiva e morte por doença (De Paula *et al.*, 2005). Diversos estudos relataram taxas de sobrevida global de 67 a 88% para pacientes com até dois linfonodos comprometidos e de 7 a 54% para pacientes com mais de dois linfonodos comprometidos (De Paula *et al.*, 2005; Fraley *et al.*, 1989; Srinivas *et al.*, 1987; Horenblas e Van Tinteren, 1994; Ravi, 1993; Lopes *et al.*, 1996).

Dados epidemiológicos definem que 44 a 85% dos pacientes com câncer de pênis apresentam fimose (Micali *et al.*, 2006). Em nosso estudo, a fimose esteve presente em 72% (18/25) dos casos totais e em 70% (7/10) dos pacientes com HPV positivo. Adicionalmente, nossos achados contribuem para reforçar as evidências de que a presença de fimose é um fator de risco importante para o aparecimento do câncer de pênis. De Paula e colaboradores (2005) sugeriram que a ausência da circuncisão dificulta a higienização adequada da glândula, que associada à presença de *Mycobacterium smegmatis*, contribuem para, além da irritação crônica do epitélio, a formação do tumor peniano (De Paula *et al.*, 2005).

O método de escolha para tratamento, tanto nos pacientes com presença de HPV como nos pacientes que não se apresentaram positivos para detecção de HPV, foi a penectomia. De fato, 28% dos pacientes analisados apresentaram como topografia a glândula e o tratamento de escolha foi a penectomia parcial. Isso demonstra que o tratamento do câncer de pênis consiste na abordagem da lesão primária e das regiões inguinais, tratando a lesão, preferencialmente por cirurgia (De Paula *et al.*, 2005).

O tratamento dos tumores com extensão maior e com invasão dos nodos regionais é controlado com cirurgia ou radioterapia. Os achados do nosso estudo são compatíveis com os

da literatura, uma vez que segundo Reis (2005) a escolha no tratamento para lesões que deformam a glândula ou para tumores profundamente invasivos, particularmente aqueles com lesões que envolvem o eixo distal, são controlados geralmente por penectomia parcial (Reis, 2005).

O uso do conjunto de *primers* GAPDH mostrou-se eficaz para avaliar a qualidade da extração de DNA das amostras congeladas. O uso de *primers* que amplificam genes endógenos é importante para validar tanto resultados em métodos qualitativos, quanto em quantitativos (Reis, 2005).

Várias metodologias têm sido utilizadas em estudos moleculares como: a hibridização *in situ*, a amplificação por PCR e o seqüenciamento do DNA. Contudo, a mais utilizada dentre elas é a PCR que consiste no uso de *primers* de consenso genérico e que amplificam regiões conservadas do vírus (Reis, 2005). Neste contexto, o DNA do HPV foi detectado em 34,5% (10/29) dos casos. Os achados de detecção viral no presente estudo corroboram com dados divulgados na literatura, uma vez que estudos recentes relataram ter encontrado infecções por HPV que variaram de 30 a 77% dos casos de carcinoma de pênis (Prowse *et al*, 2008; Lont *et al*, 2006; Pascual *et al*, 2007).

Primers específicos para os subtipos virais foram usados na PCR para genotipagem do vírus, sendo o HPV 16 o tipo viral mais prevalente, seguido pelo HPV 18. Os resultados demonstram que os HPVs 16 e 18, são considerados de alto risco carcinogênico e podem estar associados ao desenvolvimento do câncer peniano, como em estudos descritos na literatura (Giuliano, 2007; Heideman *et al.*, 2007; De Paula *et al.*, 2005; Castellsagué *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 1994).

Outros tipos de HPVs foram relativamente menos comuns. O HPV 6 foi encontrado em 20% dos casos, o HPV 11 em 30%, o HPV 33 em 10% e o HPV 35 em 30% dos casos. Neste

contexto, os HPVs 6 e 11 estão freqüentemente ligados ao desenvolvimento das verrugas genitais ou condilomas e a infecções benignas do trato genital (Giuliano, 2007; Gil *et al.*, 2002). Os tipos 16 e 18, principalmente, e com muito menor freqüência, os tipos 33, 35, e 45 estão associados a infecções com displasia de baixo e alto grau e com o carcinoma de pênis ou colo uterino (Mitsuishi *et al.*, 1998).

Nosso estudo demonstrou a presença de 60% de co-infecção entre o HPV 16 e os outros tipos virais, 6, 11, 18, 33 e 35. O papel da co-infecção viral na iniciação e promoção dos carcinomas ainda carece de elucidação (Gil *et al.*, 2002), mas isso pode ocorrer devido à possibilidade de múltiplos parceiros. A presença de HPV integrante da microbiota da glândula sugere que a disseminação do vírus tende a ser universal, sendo o homem um importante meio propagador entre seus parceiros sexuais (Reis, 2005). Assim, o homem atua como vetor, podendo desenvolver as lesões e verrugas condilomatosas no pênis, na cérvix uterina e causando papilomatoses laríngeas e respiratórias recorrentes no adulto e recém nascidos (Reis, 2005; Boccardo & Villa, 2004; zur Hausen, 2003).

Os tipos virais 6 e 11 são os mais freqüentemente encontrados na papilomatose laríngea. Em adultos acredita-se na contaminação através do sexo oral e em crianças a contaminação pode ocorrer de forma vertical, durante o parto de mães portadoras de HPV vaginal e cervical. A Papilomatose laríngea é enquadrada na categoria das papilomatoses respiratórias recorrentes e é dividida em dois grupos: papiloma laríngeo de início juvenil e papiloma laríngeo de início na idade adulta (Silva *et al.*, 2003; Rosenblatt *et al.*, 2005).

Os papilomas laríngeos de início juvenil são associados aos HPVs transmitidos por via vertical de uma mãe com infecção anogenital ativa ou latente. Mais de 30% de mães com condilomas genitais deram à luz a crianças que desenvolveram papilomatose laríngea de início juvenil. Estes HPVs estimulam a proliferação de papilomas nas vias aéreas,

preferencialmente, na laringe. A progressão dos papilomas é lenta, gerando uma sintomatologia progressiva de dificuldade respiratória, disfonia e tosse persistente. É importante sabermos que, apesar de ser raro (3 a 7% dos casos), pode ocorrer transformação maligna dos papilomas laríngicos (Silva *et al.*, 2003).

Os papilomas laríngicos de início na idade adulta acometem indivíduos com maior número de parceiros sexuais e maior frequência de contatos orogenitais. A hipótese de transmissão orogenital é baseada no fato de que a papilomatose da laringe e os condilomas genitais apresentam os mesmo HPV's das infecções associadas, HPV's 6 e 11, sendo o tipo 6 o mais freqüente. A área de transição de epitélios cubóide e cilíndrico na laringe e na cérvix uterina pode favorecer a ocorrência do HPV neste local e a semelhança entre essas regiões favorece preferencialmente, a infecção do epitélio da laringe (Silva *et al.*, 2003). No presente estudo, houve co-infecção com o HPV 6 em 20% dos casos e com o HPV 11 em 30% dos casos. O que torna ainda mais preocupante a presença do genoma viral.

Reis e colaboradores (2005) demonstram que é importante conduzir estudos que avaliam a frequência dos tipos de HPV's associados as neoplasias, incluindo o câncer de pênis. Adicionalmente, há relatos de casos de câncer de pênis associados ao HPV. Em geral, os tipos virais de HPV 16 e 18 são mais freqüentemente implicados no carcinoma de pênis (Pow-Sang *et al.*, 2002; Bezerra *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 1994).

Os resultados deste estudo e também de outros estudos epidemiológicos indicam numerosos fatores para o desenvolvimento de neoplasia peniana, dentre eles, a presença de fimose e a não circuncisão infantil, como os principais fatores de risco (Van Howe, 2007; Micali *et al.*, 2006; De Paula *et al.*, 2005) embora, também esteja sendo esclarecido o importante papel da presença do HPV nos pacientes com essa neoplasia. O carcinoma de

pênis é uma doença rara, portanto não há elucidação da carcinogênese neste tipo particular de neoplasia e estudos que investigam estes fatores devem ser estimulados.

7. Conclusão

O estudo da correlação entre o câncer de pênis e a infecção pelo HPV é importante para determinar a prevalência deste vírus nos casos de tumores penianos e para analisar a possível influência deste genoma na etiologia desses tumores.

O principal objetivo do estudo foi detectar e genotipar HPV em espécimes biológicos de tumor de pênis. Cumprindo o objetivo, o DNA do HPV foi amplificado em 10 amostras (34,5%). O genoma do HPV 6 foi amplificado em 20% (2/10), o do HPV 11 e HPV 18 em 30% (3/10), o HPV 16 em 100% (10/10) das amostras com GP5+/6+ positivas. O HPV 33 foi detectado em 10% (1/10) das amostras, o HPV 35 em 30% (3/10), e os HPVs 45 e 58 não foram encontrados. Houve co-infecção em 60% dos casos. E o tratamento de escolha foi à penectomia parcial.

O estudo também tinha como objetivo, determinar possíveis associações existentes entre a presença viral e os aspectos clínico - patológicos. Não houve relação entre o tipo de HPV encontrado e a morfologia do tumor, descrita nos prontuários.

A morfologia prevalente no estudo foi o carcinoma escamoso e a classificação de Jackson II. A fimose esteve presente em 70% dos pacientes com HPV, demonstrado que ela pode ser considerada como um dos fatores de risco para formação da neoplasia.

O presente estudo contribuiu para a geração de conhecimento, uma vez que podemos dizer que o HPV pode estar associado ao processo de iniciação e promoção de tumores, junto a outros fatores de risco como a fimose, a má higiene e a promiscuidade. Entretanto, devido a falta de informação sobre o real papel do HPV na carcinogênese dos tumores penianos, estudos elucidativos ainda precisam ser realizados.

8. Referências Bibliográficas

- Barrasso R, Debrux J, Croissant O, Orth G.: *High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia*. N Engl J Med 1987;317:916-23.
- Barret TJ, Silbar JD, McGinley JP. *Genital warts-a venereal disease*. J Am Med Assoc 1954; 154: 333-4.
- Beggs JH, Sprat JS.: *Epidermoid carcinoma of penis*. J Urol 1964;91:166-72.
- Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. *Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy*. Cancer, 2001; 91: 2315-21.
- Boon ME, Schneider A, Cornelis JA, Hogewoning CJA, Van Der Kwast TH, Bolhuis P, Kok LP. *Penile studies and heterosexual partners: peniscopy, cytology, histology, and immunocytochemistry*. Cancer, 1988; 61:1652-9.
- Boccardo E, Villa, LL. *Vírus e Câncer*. In: Ferreira CG, da Rocha JCC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2004; 1ed. p. 123-132.
- Bosch FX, Castellsagué X, Munoz N, Sanjosé S, Ghaffari AM, González LC, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Navarro C, Vergara A, Ascunce N, Guerrero E, Shah KV.: *Male Sexual Behavior and Human Papillomavirus DNA: Key Risk Factors for Cervical Câncer in Sapin*. Journal of the National Cancer Institute, 1996; Vol. 88, nº 15 August 7.
- Boxer RJ, Skinner DG.: *Condylomata acuminata and squamous cell carcinoma*. Urology 1977; 9:72-78.
- Brown DR, Fife KH. *Human papillomavirus infections of the genital tract*. Méd Clin North Am 1990; 74:1455-85.
- Cabanas RM. *An approach for the treatment of penile carcinoma*. Câncer 1977; 39: 456-66.

- Castellsagué X, M.D., Bosch X, M.D., Munoz N, M.D., Chris J.L.M. Meijer, Ph.D., Keerti V. Shah, Dr.P.H., de Sanjosé S, M.D., Eluf-Neto J, M.D., Ngelangel CA, M.D., Chichareon S, M.D., Smith JS, Ph.D., Herrero R, M.D., Franceschi S, M.D., for International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. : *Male Circumcision, Penile Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer in Female Partners*. New England Journal of Medicine, 2002; vl. 346, n. 15, April 11.
- Cavalcanti SMB, e Carestiato FN. *Infecções Causadas pelos Papilomavírus Humanos: Atualizações sobre Aspectos Viroológicos, Epidemiológicos e Diagnóstico. Human Papillomavirus Infection: Update on virological and Epidemiological Aspects and Diagnosis*. A Review. DST – J bras Doenças Sex Transm, 2006; 18(1): 73-79.
- Chan KW, Lam KY, Chan ACL, Lau P, Srivastava G. *Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in penile carcinoma: a study of 41 cases using PCR*. J Clin Pathol 1994; 47: 823-826
- Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, Carter JJ, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Krieger JN. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. Int J Cancer. 2005;116(4):606-16.
- Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. *Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation*. J Virol, 1993; 67:2521-2528.
- Dawson DF, Duckworth JK, Bernhardt H, Young JM.: *Giant condyloma and verrucous carcinoma of the genital area*. Arch Pathol, 1965; 79:225-31.

- De Paula AAP, Netto JCA, Da Cruz AD, Júnior RF. *Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico*. Revista Brasileira de Cancerologia 2005; 51(3): 243-252
- Dell G., Gaston K.: *Contributions in the domain of cancer research: Review Human Papillomaviruses and their role in cervical cancer*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 2001; 58: 1923-1942.
- Dewire D., Lepor H.: *Anatomic considerations of the penis and its lymphatic drainage*. Urol Clin North Am 1992;19:211-19.
- Dodge OG. *Carcinoma of the penis in East Africans*. J Bras Urol 1965; 37:223-26
- Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Naphtine S, Sterling J, Winter G and Griffin H. *Characterization of events during the late stages of HPV-16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4*. Virology, 1997; 238, 40-52.
- Dorfman S, Cavazza M, Cardozo J. *Penile cancer associated with so-called low-risk human papilloma virus. Report of five cases from rural Venezuela*. Rev. Trop Doct (Tropical doctor), 2006; vol 36, ed 4; 232-3.
- Droller MJ. *Carcinoma of the pênis an overview*. Urol Clin North Am 1980; 7: 783-4.
- Eisenstein BI. *The Polimerase Chain Reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis*. The New England Journal of Medicine, 1990; 322(3): 178-183.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. *Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells*. Genes Dev, 2001; 15:50-65.
- El-Zein R, Gu Y, Sierra MS, Margaret R, Spitz and Sara S. Strom.: *Chromosomal Instability in Peripheral Blood Lymphocytes and Risk of Prostate Câncer*. Department of

- Epidemiology, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2005; Vol. 14, 748-752.
- Farah SB. *DNA no diagnóstico das doenças humanas. In: DNA: segredos e mistérios*. São Paulo: Sarvier; 2000. p. 103-40.
- Fehrmann F, Laimins LA. *Human Papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation*. *Oncogene*, 2003, 22, 5201 – 5207
- Flores ER, Allen Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF. *Establishment of the Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Life Cycle in an Immortalized Human Foreskin Keratinocyte Cell Line*. *Virology*, 1999, vol 262, 344-354
- Fraleley EE, Zhang G, Sazama R, Lange PH. *Câncer of the pênis Prognosis and treatment plans*. *Câncer* 1985; 55: 1618-24.
- Fraleley EE, Zhang G, Manivel C, Niehans GA. *The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis*. *J Urol*. 1989; 142:1478-2
- Gilliland FD, Key CR: *Tumor Registry, University of New México School of Medicine*. Department of Medicine, New México, 1995 Jan 1;75(1 Suppl):295-315.
- Gil A.O., Pompeo A.C.L., Goldstein P.J., Saldanha L.B., Mesquita J.L.B., Arap S.: *Analysis of the Association Between Human Papillomavirus with Penile Carcinoma*. *Brazilian Journal of Urology* 2001, 27: 461-468.
- Gil A.O., Pompeo A.C.L., Goldstein P.J., Saldanha L.B., Mesquita J.L.B., Arap S.: *Analysis of the Association Between Human Papillomavirus with Penile Carcinoma*. *Brazilian Journal of Urology*. 2002; 28
- Giuliano AR. *Human papillomavirus vaccination in males*. *Gynecologic Oncology* 2007; 107-S24-S26

- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. *Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses*. Journal of Microbiology, 2000, vol 38, n-1; p. 357-361.
- Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, Haas GP, Lancaster WD. *Preferential association of human papillomavirus wuith high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma*. J Natl Cancer Inst. 1995; 87: 1705-9
- Griffiths TRL & Mellon JK. *Human Papillomavirus and Urological tumours: I. Basic science and role in penile cancer*. Brazilian Journal of Urology 1999, 84: 579 - 586.
- Gross G, Fister HP. *Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts*. Med Microbiol Immuno (Berl). 1993; 193(1): 35-44
- Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. *The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells*. 1991; J Virol 65:473-478.
- Hebner CM and Laimins LA.: *Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity* – Rev. Med. Virol. 2006; 16: 83-97
- Heideman DAM, Waterboer T, Pawlita M, Diemen PDV, Nindl I, Leijte JA, Bonfrer JMG, Horenblas S, Meijer CJLM, Snijders PJF. *Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol 2007; 25:4550-4556
- Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. *Penile câncer: Is there na epidemiological role for smoking and sexual behaviour?* British Medical Journal. 1987; Vol 295 21. November.

- Horenblas S, Van Tinteren H.: *Squamous cell carcinoma of the pênis IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes, and metastasis classification system.* J Urol 1994; 151: 1239-43.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) Working Group. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.* Human Papillomaviruses 1995, 64
- INCA. *Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 2008.* <http://www.inca.gov.br/conteudo>. Acessado em 28/ abril/ 2008.
- Iversen T, Tretli S, Johansen AA, Holte T.: *Squamous cell carcinoma of the penis and of the cervix, vulva and vagina in spouses: Is there any relationship? An epidemiological study from Norway, 1960-92.* Br J Cancer 1997;76:558-60.
- Jackson SM. *The treatment of carcinoma of the pênis.* Br J Surg 1966; 53: 33-5.
- Jansen KU., Shaw AR.: *Human Papillomavirus Vaccines and Prevention of Cervical Cancer.* Annu. Rev. Med. 2004, 55:319-31.
- Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. *Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response.* Current Cancer Drug Targets, 2007, 7: 79-89.
- Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristenseng, Holm R, Johansson B and Hagmar B. *Use of multiple PCR primers sets for optimal detection of Human Papillomavirus.* Journal Clinical Microbiology 1996, 34 (09): 2095 - 2100.
- Lam KY, Chan ACL, Chan KW, Mei L. Leung and Gopesh Srivastava. *Expression of p53 and its relationship with human papillomavirus in penile carcinomas.* Department of Pathology, Queen Mart' Hospital, Hong Kong. European Journal / Surgical Oncology 1995; 21 : 613-616
- Lamberti C, Morrissey LC, Grossman SR, Androphy EJ. *Transcriptional activation by the papillomavirus E6 zinc finger oncoprotein.* Embo J 1990; 9: 1907-13

- Le Moal MA, Thierry F. HPV and viral genes. In: Monsonego J (ed). *Papillomavirus in human pathology*. Rome: Aresserono Symposia; 1995. p. 1-11
- Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ 2nd, Dotto GP, DiMaio D. *Tumorigenic transformation of mouse keratinocytes by the E5 genes of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1*. J Virol, 1991 ; 65:7078-7083.
- Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, Villa LL. *Human Papillomavirus DNA and p53 Status in Penile Carcinomas*. International Journal of Cancer 1998, 76: 779 - 783.
- Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, Band V, Androphy EJ. *Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells*. J Virol, 1999; 73, 7297-7307.
- Lont AP, Gallee MPW, Snijders P, Horenblas SJ. *Sarcomatoid squamous cell carcinoma of the penis: a clinical and pathological study of 5 cases*. UROL 2004; 172(3): 932-35
- Lont AP, Kroon BK, Horenblas S et al. *Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival*. Int J Cancer 2006; 119:1078-81.
- Lopes A, Hidalgo GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. *Prognostic factors in carcinoma: of the penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy*. J Urol. 1996; 156:1637-41.
- Lopes A, Bezerra AL, Serrano SV, Hidalgo GS. *Iliac nodal metastases from carcinoma of the penis treated surgically*. BJU. Int- 2000; 86:690-3.
- Maden C, Sherman KJ, Beckman AM. et al: *History of circumcision, medical conditions and sexual activity and risk of penile cancer*. J Natl Cancer Inst 1993;85:19-24.
- Maiche A.G.: *Epidemiological aspects of the cancer of the penis in Finland*. Eur J Cancer Prev 1992;1:153-158.

- Malek RS.: *Laser treatment of premalignant and malignant squamous cell lesions of the penis*. Lasers Surg Med 1992;12:246-53.
- McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, et al. *Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil*. Int J Cancer. 1986; 37: 55-9.
- Meisels A, Fortim R, Roy M. *Condylomatous lesions of the cérvix I. Cytologic patterns*. Acta Cytol 1976; 20: 505-509.
- Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. *Penile Cancer* 2006; 54: 369-91
- Mitsuishi T, Sata T, Iwasaki T. *The detection of human papillomavirus 16 in erythroplasia of Queyrat invading the urethra*. Br J Dermatol 1998; 138: 188-9
- Mostofi FK, Price RB Jr. *Tumors and tumor-like lesions of the pênis*. In: *Tumors of the male genital system*. Washington DC. Armed Forces Inst Pathol 1973; 277: 263-6.
- Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Fizzell MA, Howley PM, Sakai H. *Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition*. J Vriol 2000; 74:3752-3760
- Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Costa ALL. *HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica*. Rev Bras Otorrinolaringol. V.69, n.4, 553-9, jul./ago. 2003
- Ornellas AA, Seixas ALC, Marota A, Wisnescky A, Campos F, de Moraes JR. *Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases*. J Urol. 1994;151:1244-9.

- Pascual A, Pariente M, Godínez JM, Sánchez-Prieto R, Atienzar M, Segura M, Poblet E. *High prevalence of human papillomavirus 16 in penile carcinoma. Histol Histopathol. 2007;22(2):177-83*
- Partridge JM & Koutsky LA. *Genital human papillomavirus infection in men. A review. Vol 6 January 2006; Lancet Infect Dis 2006; 6:21–31*
- Pascual A, Pariente M, Godínez JM et al. *High prevalence of human papillomavirus 16 in penile carcinoma. Histol Histopathol 2007; 22:177-83*
- Passaglia LM, Zaha A. *Técnicas de DNA recombinante. In: Zaha A, editor. Biologia molecular básica. 3a ed. Porto Alegre: Mercado Aberto; 2001. p. 307-31.*
- Pettaway C, Lynch DF. AUA Update Series. *Penile Cancer: contemporary Surgical Management of the inguinal and pelvic Nodes. 2002, vol 21., lesson 33*
- Picconi MA, Eiján AM, Distéfano AL, Pueyo S, Alonio LV, Gorostidi S, Teyssié AR, Casabé A. *Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: analysis of primary tumors and lymph nodes. J Med Virol. 2000;61(1):65-9.*
- Pompeo ACL & Gil AO. *HPV e Câncer de pênis. In: Rosenblatt C, Wroclawski ER. Lucon AM, Pereyra EAG. HPV na Prática Clínica. São Paulo: Atheneu, 2005. p.174 – 175.*
- Pompeo ACL. *Linfadenectomia inguinal estadiada em câncer de pênis: avaliação prospectiva de 50 pacientes (Tese de livre Docência). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1993, p. 124.*
- Porche DJ. *Genital Human Papillomavirus Infection in Men. MEN'S HEALTH. The Journal for Nurse Practitioners – JNP November/December 2007*
- Pow-Sang MR, Benavente V, Pow-Sang JE, Morante C, Meza L, Baker M, Pow-Sang JM. *Cancer of the penis. Cancer Control 2002, 9 (4): 305-314.*

- Prowse DM, Ktori EM, Chandrasekaran D, Prapa A, Baithun S. *Human papillomavirus-associated increase in p16(INK4A) expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma*. Journal Compilation. British Association of Dermatologists. British Journal of Dermatology – 2008, 158, pp261–265,
- Ravi R. *Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis*. Br J Urol. 1993; 72: 817-9
- Reis AAS. *O papel do Papiloma Vírus Humano na carcinogênese dos tumores dos tumores de pênis: uma abordagem epidemiológica e molecular*. (Dissertação de Mestrado em Genética) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - Goiânia, 2005.
- Rosemberg SK, Greenberg MD, Reid R. *Sexually transmitted papillomaviral infection in men*. Obst Gynecol clin North Am 1987; 14: 495-512
- Rosenblatt C, Wroclawski ER, Lucon AM, Pereyra EAG. *HPV na Prática Clínica*. Ed Atheneu, 2005. 7-23
- Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WGV and Pirog EC. *Detection and typing of Human Papillomavirus DNA in penile carcinoma*. American Journal of Pathology 2001, 159 (4): 1211 – 1218.
- Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. *Detection of human papillomavirus in suamous neoplasm of the penis*. J Urol. 1992; 147:389.
- Senba M, Kumatori A, Fujita S, Jutavijittum P, Yousukh A, Moriuchi T, Nakamura T, Toriyama K. *The prevalence of human papillomavirus genotypes in penile cancers from northern Thailand*. J Med Virol. 2006 Oct;78(10):1341-6.

- Shew ML & Fortenberry JD. *HPV Infection in Adolescents: Natural History, Complications, and Indicators for Viral Typing*. Semin Pediatr Infect Dis, 2005; 16: 168-174.
- Shope RE, Hurst W. *Infectious papillomatosis of rabbits*. J Exp Med 1933; 58:607- 625
- Silva AMTC, Amaral MVT, Da Cruz AD.: *O Papel do Papilomavírus Humano na Carcinogênese*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2005 - nº 29.
- Silva AMTC, Da Cruz AD, Da Silva CC, Borges FR, Curado MP. *Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente*. Revista Brasileira de Cancerologia, 2003, 49(3): 167-174
- Skinner DG, Leadbetter WF, Kelley SB. *The surgical management of squamous cell carcinoma of the pênis* J Urol 1972; 107: 273-8.
- Souto R, Falhari JPB, Cruz AD.: *O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. The Human papillomavirus: a factor related with the formation of neoplasias*. Revista Brasileira de Cancerologia 2005; 51(2): 155-160
- Srinivas V, Morse MJ, Herr HW, Sogani PC, Whitmore WF Jr. *Penile cancer: relation of extent of nodal metastasis to survival*. J Urol. 1987; 137(5): 880-2
- Taylor, G. R.: *Polimerase Charin Reaction: basic principles and automation*. In: Mc Pherson, M.J.; Quirke, P. Taylor, G.R. PCR: a practical approach. New York: Oxford University Press, p. 1-13, 1993
- Tonon LM, Secoli SR, Caponero R.: *Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe*. A review of bevacizumab and its use in colorectal câncer. Revista Brasileira de Cancerologia 2007; 53(2): 173-182
- Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S, Botti G, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Gallo A, Buonaguro L, Buonaguro FM.: *Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma*. Int J Cancer. 2008; 1;122(1):132-7.

- Tyring SK. *Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response*. J Am Acad Dermatol 2000; 43; 518-526.
- Van Howe RS. *Human papillomavirus and circumcision: A meta-analysis*. Department of Pediatrics, Michigan State University College of Human Medicine. Journal of infection, 2007; 54: 490-496
- Villa LL. *Human papillomaviruses and cervical cancer*. Adv Cancer Res. 1997; 71:321-341
- Weinberg RA. *Uma célula renegada: como o câncer começa*. Rio de Janeiro. Ed Rocco, 2000.
- Wang JB, Man XH, Liu YH, Fang K. Detecting HPV DNA in tissues of external genital squamous cell carcinoma in situ by PCR-RFLP technique. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2003;25(6):667-70.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53*. Science 248:76-79, 1990.
- Young RH, Srigley JR, Amin MB. *Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra and penis*: Armed Forces Institute of Pathology Fascicle, Third Series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 2000.
- Zur Hausen HI. *H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2(5): 342-350, 2002.
- Zur Hausen HI. *Human Papillomavirus infections*. Curr Top Microbiol Imunol 1977; 78: 1-30

9. Anexos

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP/ACCG - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

PROCOLO CEPACCG Nº 007/06 Goiânia, 03/05/2007

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Biom. Antoniella
Fernanda Mendanha Souza

TÍTULO: "Detecção e Genotipagem de Papilomavirus Humano em
Tumores de Pênis"

Área Temática: Grupo III

Local de Realização: ACCG/Hospital Araújo Jorge- Urologia

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG, aprovou
sem restrições o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi
considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão
Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG,
relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento,
conclusão(ões) e publicação(ões).


DR. GERALDO SILVA QUEIROZ
Coordenador do CEPACCG

Rua 239 nº 181- Setor Universitário – Goiânia - Goiás CEP.74 605-070
Fone: (62) 3243-7050

PARECER DO RELATOR

TÍTULO: Detecção e genotipagem de papiloma vírus humano em tumores de pênis.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Antoniella Fernanda Mendanha Sousa

ORIENTADOR: Aparecido Divino da Cruz Ph. D.

CO-ORIENTADORA: Ângela Adamski da Silva Reis, M. Sc.

Entrada no CEP-ACCG dia 28 de Março de 2007.

DOCUMENTOS RECEBIDOS:

1. Projeto de pesquisa composto dos seguintes documentos
2. Carta de apresentação do projeto de pesquisa ao CEP-ACCG.
3. Folha de rosto
4. Carta da pesquisadora responsável solicitando autorização a chefia do Serviço de Anatomia Patológica do HAJ para o desenvolvimento da pesquisa.
5. Carta da Dra. Eliane Duarte Mota Chefe da Anatomia Patológica concedendo autorização da pesquisa em seu Departamento.
6. Carta da pesquisadora responsável solicitando ao Dr. Adriano de Paula Chefe do Serviço de Uro-oncologia autorização para a utilização de pacientes daquele setor como sujeitos do presente projeto de pesquisa.
7. Carta resposta do Dr. Adriano de Paula chefe do Serviço de Uro-oncologia concedendo autorização para a realização da presente pesquisa com a utilização de sujeitos do seu Serviço.
8. Carta da pesquisadora responsável ao Diretor técnico do HAJ Dr. Francisco Dourado, solicitando autorização para o manuseio dos blocos de parafina necessários ao desenvolvimento da pesquisa.
9. Carta do Diretor Técnico do HAJ dando autorização para o manuseio dos blocos de parafina necessários ao desenvolvimento da pesquisa.
10. Carta da pesquisadora responsável a Chefia do arquivo do HAJ solicitando autorização para o manuseio dos prontuários dos sujeitos da presente pesquisa.
11. Carta da Chefia do arquivo concedendo autorização para o manuseio dos prontuários.
12. PROJETO DE PESQUISA: Detecção e Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em Tumores de Pênis. Com Introdução, Justificativa, Objetivos gerais e específicos, Metodologia: com Critérios de inclusão e exclusão, Descrição da população a ser estudada, Análise crítica dos riscos e benefícios, Informação do termo de consentimento livre e esclarecido, informação sobre divulgação dos resultados, Cronograma das atividades de desenvolvimento do projeto de pesquisa, Cronograma financeiro com gastos em torno de R\$ - 366.055,02 (trezentos e sessenta e seis mil e cinquenta e cinco reais e dois centavos), Reagentes e material de consumo com um gasto de R\$ 8.025,24 (oito mil e vinte e cinco reais e



vinte e quatro centavos). Perfazendo um total de gastos com a pesquisa de R\$ 374.080,26 (trezentos e setenta e quatro mil e oitenta reais e vinte e seis centavos). Análise estatística será feita pelo teste "T. de estudante". Com nível de significância de 5%. Referencias Bibliográficas

13. Currículos do pesquisador responsável e orientador e co-orientadora na forma Lattes.

Conclusão do Relator: *Presente projeto de pesquisa sem dúvida será mais uma contribuição na busca de um marcador para melhor estabelecer o diagnóstico do Câncer de Pênis como também desenvolver novas ferramentas no campo da biologia molecular com a finalidade de melhor fazer uma prevenção como à verificação de fatores prognósticos da enfermidade que apesar de não muito freqüente, com uma incidência e prevalência de 1/100.000 hb. às vezes se reveste de grande gravidade para o paciente. Desta forma somos pela conclusão de que o presente projeto de pesquisa pode nos proporcionar dados não somente de melhoria dos recursos de prevenção mais também de diagnóstico e avaliação prognostica.*

Assim sou pela aprovação do presente projeto de pesquisa sem ressalvas.

Goiânia 02 de Maio de 2007.

ORLANDO MILHOMEM DA MOTA
Relator



Anexo 2 – Dados dos Prontuários

Dados dos pacientes contendo informações colhidas de seus respectivos prontuários

Selecionados em verde: positivos para o genoma do HPV

n	Iniciais	Prontuário	Id	Dt nascim	Jackson	Tipo de tratamento	Topografia
1	LBL	2006106551	82	25/5/1925	JACKSON II	Amputação parcial	haste
2	RAC	2005105870	71	04/07/1936	JACKSON III	Amputação parcial com linfadenectomia	prepúcio e glande
3	CPM	2005112411	37	1/11/1970	JACKSON II	Amputação parcial	haste
4	SPR	2005106125	58	24/1/1949	JACKSON I	Amputação parcial	glande
5	ABP	2005105435	47	29/11/1960	JACKSON II	Amputação parcial e linfadenectomia	glande
6	ABS	2005104142	65	5/9/1942	JACKSON III	Amputação parcial	glande
7	DNE	2005110936	DNE	DNE	DNE	DNE	DNE
8	GA	2005106102	63	7/4/1944	JACKSON I	Amputação parcial	glande
9	PB	2005104368	89	16/5/1918	JACKSON III	Penectomia total e emasculação	todo o órgão
10	JFF	2005102427	66	25/6/1941	JACKSON II	Penectomia total	glande e haste
11	DNE	2004108528	DNE	DNE	DNE	DNE	DNE
12	RBO	2005102367	86	14/10/1921	JACKSON II	Amputação parcial	prepúcio
14	DNE	2005103057	DNE	DNE	DNE	DNE	DNE
15	NLC	2006101024	77	8/6/1930	JACKSON I	Amputação parcial	glande e prepúcio
16	MPS	2006106204	68	29/9/1939	JACKSON I	Amputação parcial	prepúcio
17	IFS	2005105719	42	10/10/1965	JACKSON I	Amputação parcial	glande
18	JAL	2005106300	42	21/10/1965	JACKSON IV	Amputação total com linfadenectomia	haste
19	DNE	2006104685	DNE	DNE	DNE	DNE	DNE
20	AGS	2006106031	72	21/9/1935	JACKSON I	Amputação parcial	glande
21	GT	2004109264	69	18/7/1938	JACKSON I	Amputação parcial	haste
22	ARS	2005103431	46	11/3/1961	JACKSON II	Amputação quase total	glande e haste
26	DRF	2005108893	50	18/2/1957	JACKSON II	Amputação parcial	glande e corpos cavernosos
27	PSF	2005103509	51	25/5/1956	JACKSON III	Excisão e ressecção local	glande e haste
28	BVR	2005101195	59	20/8/1948	JACKSON III	Amputação parcial e linfadenectomia inguinal	glande
30	RDF	2005112195	26	22/4/1981	JACKSON I	Amputação parcial com esvaziamento inguinal	prepúcio e glande
32	ERS	2004110023	71	20/7/1936	JACKSON II	Amputação parcial	haste / Invasão dos corpos cavernosos e uretra
33	JMS	2006100116	64	16/3/1943	JACKSON II	Amputação total com uretostomia perineal	haste
34	VCS	2005108963	71	24/9/1936	JACKSON IV	Amputação parcial com esvaziamento inguinal	prepúcio e glande
39	WPS	2005105171	66	28/5/1941	JACKSON III	Amputação total com linfadenectomia	haste

Dados dos pacientes contendo informações colhidas de seus respectivos prontuários

n	Iniciais	Prontuário	Tipo de lesão	Hábitos de vida
1	LBL	2006106551	Lesão ulcerada	<i>DNE</i>
2	RAC	2005105870	Massa vegetante e ulcerada	ex- fumante
3	CPM	2005112411	Lesão vegetante	fumante e etilista
4	SPR	2005106125	Lesão vegetante e infiltrativa	<i>DNE</i>
5	ABP	2005105435	Lesão endurecida e infiltrativa com ulceração e fistula	<i>DNE</i>
6	ABS	2005104142	Lesão vegetante	fumante
7	<i>DNE</i>	2005110936	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
8	GA	2005106102	Lesão ulcerada	<i>DNE</i>
9	PB	2005104368	Lesão ulcero - infiltrante em todo o órgão	<i>DNE</i>
10	JFF	2005102427	Lesões vegetantes	<i>DNE</i>
11	<i>DNE</i>	2004108528	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
12	RBO	2005102367	Lesão úlcero-infiltrativa	fumante
14	<i>DNE</i>	2005103057	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
15	NLC	2006101024	Lesão vegetante com área ulcerada	fumante e etilista
16	MPS	2006106204	Lesão ulcero vegetante	fumante e ex-etilista
17	IFS	2005105719	Lesão ulcero vegetante	fumante e ex- etilista
18	JAL	2005106300	Lesões endurecidas	<i>DNE</i>
19	<i>DNE</i>	2006104685	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
20	AGS	2006106031	Lesão ulcero-vegetante	fumante e etilista
21	GT	2004109264	Lesão ulcero-vegetante	<i>DNE</i>
22	ARS	2005103431	Extensa lesão ulcero - infiltrante	<i>DNE</i>
26	DRF	2005108893	Lesão infiltrante e necrose em bordas	etilista
27	PSF	2005103509	Lesões vegetantes e nódulo endurecido na glândula	etilista e ex-fumante
28	BVR	2005101195	Lesão ulcerosa	<i>DNE</i>
30	RDF	2005112195	Lesão ulcero - vegetante	fumante
32	ERS	2004110023	Lesão infiltrativa	fumante
33	JMS	2006100116	<i>DNE</i>	fumante
34	VCS	2005108963	Lesão ulcero-infiltrativa	<i>DNE</i>
39	WPS	2005105171	Lesão ulcerativa	ex- etilista

Dados dos pacientes contendo informações colhidas de seus respectivos prontuários

n	Morfologia	Dados complementares	Fimose
1	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I	<i>DNE</i>	presente
2	Carcinoma Escamoso invasor Grau II	Óbito	presente
3	Carcinoma Escamoso Grau I	<i>DNE</i>	presente
4	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I	<i>DNE</i>	presente
5	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II	Invasão de corpos cavernosos/Metástase em 2 linfonodos	presente
6	Carcinoma Escamoso Invasor grau III / IV	metástase inguinal para 1 linfonodo	presente
7	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
8	Carcinoma Epidermoide bem diferenciado Grau I invasivo	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
9	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
10	Carcinoma Escamoso Grau I bem diferenciado	Gonorréia na adolescência	presente
11	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
12	Carcinoma Escamoso Grau I bem diferenciado	<i>DNE</i>	ausente
14	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
15	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I	<i>DNE</i>	presente
16	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I	<i>DNE</i>	presente
17	Carcinoma Verrucoso invasor Grau I	<i>DNE</i>	presente
18	Carcinoma Espinocelular Grau II	Metástase em 4 linfonodos inguinais / Óbito	presente
19	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>	<i>DNE</i>
20	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II	Metástase em 3 linfonodos	presente
21	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I	<i>DNE</i>	presente
22	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II	DST há 12 anos	presente
26	Carcinoma Escamoso Invasor Grau II	<i>DNE</i>	presente
27	Carcinoma Escamoso Grau II moderadamente diferenciado	Metástase pulmonar / Óbito	ausente
28	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I	Múltiplas metástases ósseas	presente
30	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I bem diferenciado	macrometástase em 1 linfonodo	presente
32	Carcinoma escamoso grau II	<i>DNE</i>	ausente
33	Carcinoma Escamoso Invasor Grau I	<i>DNE</i>	presente
34	Carcinoma Escamoso Grau II	Invasão de corpos cavernosos	ausente
39	Carcinoma Espinocelular invasor Grau II	Metástase em ambos linfonodos / Presença de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> / Óbito	<i>DNE</i>

DNE: Dados não encontrados

Anexo 3 – Protocolo do kit de extração e purificação de DNA genômico Wizard – Promega (*Promega Corporation, EUA*)®

Isolamento de DNA genômico de tecido animal

Preparo do tecido:

- Adicionar 10 a 20 mg de tecido fresco ou descongelado, macerado em 600 µL de solução de lise nuclear (*Nuclei lysis solution*) e homogeneizar por 10 segundos.
- Incubar a 65°C por 15 a 30 minutos

Lise e precipitação protéica:

- Adicionar 3µL de solução de RNase (*RNase solution*) na solução lisada e misturar.
- Incubar a 37°C por 15 a 30 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar 200µL de solução de precipitação protéica (*Protein precipitation solution*).
- Vortexear e resfriar em gelo por 5 minutos.
- Centrifugar a 13.000 – 16.000 por 4 minutos.

Precipitação e reidratação do DNA

- Transferir o sobrenadante para um tubo limpo contendo 600µL de isopropanol à temperatura ambiente.
- Misturar gentilmente por inversão.
- Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm por 1 minuto.
- Remover o sobrenadante e adicionar 600µL de etanol a 70% à temperatura ambiente e misturar.
- Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm por 1 minuto.
- Aspirar o etanol e secar o pellet ao ar por 15 minutos.
- Reidratar o DNA em 100µL de solução de reidratação de DNA (*DNA rehydration solution*) por 1h a 65°C ou *overnight* a 4°C.

Anexo 4 - Protocolos de amplificação de DNA por PCR e protocolos de termociclagem

A PCR é uma técnica de amplificação de sequências de DNA *in vitro* que amplifica sequências específicas de DNA. Esta técnica foi nomeada por Mullis e colaboradores em 1985, apesar de o princípio ter sido descrito com detalhes por Khorana e colaboradores quase dez anos antes (Taylor, 1993). A importância deste procedimento está na possibilidade de amplificar o DNA inteiro ou fragmentado por meio de uma reação. Por meio da técnica se tornou possível a amplificação de sequências de DNA específicas de vários tamanhos e de forma rápida (Eisenstein, 1990). Para essa amplificação, usam-se dois *primers* (*Forward e Reverse*) que hibridizam com as fitas opostas, flanqueando o DNA alvo. Na prática, o que fazemos é adicionar uma pequena quantidade de DNA genômico, quatro nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), íons Mg^{2+} , a enzima taq DNA-polimerase, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) necessários para a ação da polimerase e a solução tampão, que fornecerá as condições de pH e salinidade para o processamento de fragmentos de DNA (Passaglia & Zaha, 2001). O tubo de ensaio contendo o DNA, os dNTPs, o Cloreto de Magnésio, a taq e os *primers* é submetido a uma temperatura inicial, geralmente, de 94°C por 5 minutos, para provocar a desnaturação física das moléculas de DNA, através da ruptura das pontes de hidrogênio que mantêm as fitas complementares unidas. Em seguida, a temperatura é rebaixada para cerca de 30 a 60°C por 30 segundos, quando ocorre o anelamento dos *primers*, flanqueando a região do DNA de interesse, que será amplificada. Finalmente, a temperatura é aumentada para 72°C por 1 minuto, que corresponde a temperatura na qual a atividade da Taq-polimerase é máxima, que, então, sintetiza uma nova fita de DNA. A repetição dos passos de desnaturação, anelamento e síntese, por 30 ciclos é suficiente para a obtenção de milhares de fragmentos do DNA alvo (Farah, 2000).

Protocolos usados no estudo

As extrações de DNA forma confirmadas com o uso do conjunto de *primers* GAPDH de acordo com o protocolo abaixo.

Protocolo das reações individuais de PCR para GAPDH

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume / 1 reação (µl)
Tampão	10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂	50mM	2mM	1,0 µL
Taq DNA pol	5U/µL	1U	0,25 µL
dNTP	2,5mM	0,25mM	2,5µL
Primer P1	Anexo 7	2,5 µM	1,0 µL
Primer P2	Anexo 7	2,5 µM	1,0 µL
H ₂ O miliQ	N/A	N/A	15,75 µL
DNA (amostra)	N/A	N/A	1,0 µL
Total			25 µL

Os fragmentos de DNA de HPV foram amplificados pela técnica de PCR com o uso do *primer* GP5+/6+, de acordo com o protocolo a seguir.

Protocolo das reações individuais de PCR para os *primers* GP5+/6+

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume / 1 reação (µl)
Tampão	10X	1X	2,5µL
MgCl ₂	50mM	3mM	1,5µL
Taq DNA pol	5U/µL	1U	0,2µL
dNTP	2,5mM	0,2mM	2,0µL
Primer GP5+/6+	15pmol	0,5pmol	0,8µL
H ₂ O miliQ	N/A	N/A	16,0µL
DNA (amostra)	N/A	N/A	2,0µL
Total			25µL

N/A: Não aplicável

Para cada amostra positiva para o Genoma do HPV, foi feita a genotipagem para os tipos virais 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58, de acordo com o protocolo a seguir:

Protocolo das reações individuais de PCR para genotipagem

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	VOLUME / 1 reação (µl)
Tampão	10X	1X	2,5µL
MgCl	50mM	3,6mM	1,8µL
Taq DNA pol	5U/ µL	1U	0,2µL
dNTP	2,5mM	0,2mM	2,0µL
Primer tipo-específico	15 pmol	0,5 pmol	0,8µL
H ₂ O miliQ	N/A	N/A	16,7µL
DNA (amostra)	N/A	N/A	1,0µL
Total			25µL

N/A: Não aplicável

Os protocolos de termociclagem utilizados para as reações de GAPDH, GP5+/6+ e genotipagem, estão ilustrados nas tabelas seguintes, respectivamente:

Protocolo de termociclagem para amplificação do controle interno da reação com o *primer* GAPDH

Estágios	Temperatura °C	Tempo (minutos)	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	5	1
Desnaturação Cíclica	94	0,5	35
Anelamento	59	1	
Extensão Cíclica	72	1	
Extensão Final	72	7	1
Repouso	4	∞	N/A

N/A: Não aplicável

Protocolo de termociclagem para amplificação de fragmentos do genoma do HPV, utilizando o *primer* GP5+/6+

Estágios	Temperatura °C	Tempo (minutos)	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	95	5	1
Desnaturação Cíclica	95	0,3	40
Anelamento	50	2	
Extensão Cíclica	72	1	
Extensão Final	72	7	1
Repouso	4	∞	N/A

N/A: Não aplicável

Protocolo de termociclagem para amplificação de fragmentos do genoma do HPV, utilizando os primers específicos para genotipagem: HPVs 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58.

Estágios	Temperatura °C	Tempo (minutos)	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	10	1
Desnaturação Cíclica	94	1	10
Anelamento	51	1	
Extensão Cíclica	72	1	
Desnaturação Cíclica	94	1	35
Anelamento	46	1	
Extensão Cíclica	72	1	
Extensão Final	72	1	1
Repouso	4	∞	N/A

N/A: Não aplicável

Anexo 5 – Protocolo para o preparo de gel de poliacrilamida a 8%

Com a influência de uma diferença de potencial elétrico, átomos, moléculas e partículas providas de cargas, em solução aquosa, são capazes de migrar na direção do eletrodo de carga oposta. Essa migração, em meio de viscosidade definida, acontecerá em diferentes velocidades, uma vez que as moléculas apresentam cargas e massas variáveis.

A eletroforese é um método de separação de biomoléculas conhecido há muitos anos. Foi utilizada, principalmente, para separar RNAs e proteínas. Após a década de 70, a eletroforese passou a ser utilizada para a separação de moléculas de DNA. A separação eletroforética de DNA é possível devido ao excesso de carga negativa, devido à presença de grupamentos fosfatos ionizáveis e açúcar em sua estrutura. Desta forma, quando submetido a um campo elétrico uniforme, em pH neutro, as moléculas de DNA migram do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo). Sob a ação do campo elétrico e por estar inserido em uma matriz que oferece determinada resistência à migração, as moléculas de DNA pequenas percorrerão maiores distâncias que as grandes. Esta migração diferencial permite a separação dos fragmentos de acordo com seu tamanho, peso molecular, complexidade e conformação (Farah, 2000).

A matriz de resistência pode ser constituída de agarose, que possuem poros que permitem a separação de fragmentos que variam de 200pb a 50kb, e de poliacrilamida, que permitem a separação de fragmentos muito pequenos até de 1000pb.

A força iônica, concentração total de íons, do tampão deve ser baixa, o mínimo para garantir um pH constante, reduzindo-se, desta forma, as correntes iônicas que fluem pelo gel e a dissipação térmica excessiva.

No presente estudo, todos os géis usados para separar os fragmentos de DNA, amplificados por PCR, foram de poliacrilamida a 8%.

Protocolo de preparação do gel de poliacrilamida a 8% (Gel para cuba de 45 ml)

Reagentes	Volume
Acrilamida 40%	9,0 ml
TBE 10X	4,5 ml
H ₂ O dd	31,5 ml
APS 10%	450 µl
TEMED	45 µl

Confecção da acrilamida a 40% Acrescenta-se acrilamida e bis-acrilamida em uma proporção de 19:1 ou 380g de acrilamida para 20g de bis-acrilamida – q.s.p. 1000mL.

Soluções utilizadas:

Tris-Borato de EDTA (TBE 10x)

- Tris base 108 g
- Ácido bórico 55 g
- EDTA 0,5 M (pH 8.0) 40 mL
- H₂O q.s.p 1000ml

EDTA 0,5M pH 8,0

- EDTA (pm 372,24) 186.12 g
- H₂O q.s.p 1000 mL
- Controle o pH com NaOH (20 g de NaOH)

Persulfato de Amônia (APS 10%)

- APS 10 g
- H₂O q.s.p 100 mL

Corante de Corrida 6x

- Azul de Bromofenol 0.25%
- Xileno Cianol FF 0.25%
- Ficol tipo 4000 15%
- EDTA 120 mM

Tampão de eletroforese

Usa-se o tampão de corrida TBE 1,0X, produzido a partir do tampão estoque TBE 10X. A corrida é controlada a 10 v/cm

Anexo 6 – Protocolo de coloração rápida pelo nitrato de prata

Reagentes necessários:

- Etanol P.A
- Ac. Acético
- Formaldeído 37%
- Solução de Hidróxido de sódio (NaOH) a 30%
- Solução de Nitrato de Prata (AgNO_3) a 15%

Preparo dos reagentes:

- Hidróxido de sódio: 30g de NaOH + H_2O q.s.p. para 100ml
- Nitrato de Prata: 15g de AgNO_3 + H_2O q.s.p. para 100ml

Preparo das soluções:

- Solução de Fixação

50ml de Etanol P.A
2ml de ac. Acético
q.s.p. 300ml

- Solução de Revelação

15ml de solução de solução de NaOH 30%
2ml de Formaldeído 37%
q.s.p 200ml

- Procedimento

Adicionar 150ml da solução de fixação no recipiente com gel.
Adicionar 2ml de solução de AgNO_3 15%
Deixar em agitação contínua por 5min
Desprezar a solução e lavar com água deionizada 2 vezes por 15 seg cada vez
Adicionar a solução reveladora e em movimento constante aguardar a revelação das bandas
Desprezar a solução de revelação e acrescentar o restante da solução de fixação

Anexo 7 – Informações Sobre os *Primers* Utilizados

LIFE TECHNOLOGIES

Número da Ordem: 011685 01

Data da Ordem: 24/09/2002

Invitrogen Brasil Custom Primers

Certificado de Análise

Primer: HPV – GP5+ F		Número do Primer: D1124F06 (F06)
Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz		Tamanho do Primer: 23
Seqüência (5' → 3'): TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC		Escala de Síntese: 200 nmol
Peso Molecular (µg/µmol): 7433,6		µg por OD: 29,6
Coef. Milimolar de Extringência (OD/µmol): 250,7		nmoles por OD: 3,9
Pureza	Padrão	OD's 33,42
Tm (1M Na⁺)	66	µg's 990,95
Tm (50 mM Na⁺)	45	nmoles 133,3
%CG	20	Coupling Eff. 98%

Primer: HPV- GP6+ R		Número do Primer: D1124F06 (F06)
Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz		Tamanho do Primer: 25
Seqüência (5' → 3'): GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C		Escala de Síntese: 200 nmol
Peso Molecular (µg/µmol): 8073,0		µg por OD: 26,0
Coef. Milimolar de Extringência (OD/µmol): 309,8		nmoles por OD: 3,2
Pureza	Padrão	OD's 35,82
Tm (1M Na⁺)	66	µg's 933,42
Tm (50 mM Na⁺)	41	nmoles 115,7
%CG	20	Coupling Eff. 98%

Invitrogen Brasil Custom Primers

Certificado de Análise

LIFE TECHNOLOGIES

Número da Ordem: 011685 01

Data da Ordem: 24/09/2002

Primer: HPV6 LEFT

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): CAC GTC TGC AAC GAC CAT AG

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6384,0Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 218,7**Pureza Padrão****Tm (1M Na⁺) 70****Tm (50 mM Na⁺) 49****%CG 55**

Número do Primer: D0482D03 (D03)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 29,2

nmoles por OD: 4,5

OD's 30,48 **$\mu\text{g}'\text{s}$ 891,13****nmoles 139,2****Coupling Eff. 98%****Primer: HPV6 RIGTH**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): CCA TGA AAT TCT AGG CAG CA

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6433,0Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 228,5**Pureza Padrão****Tm (1M Na⁺) 66****Tm (50 mM Na⁺) 45****%CG 45**

Número do Primer: D0482D04 (D04)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 28,1

nmoles por OD: 4,3

OD's 25,19 **$\mu\text{g}'\text{s}$ 709,18****nmoles 110,3****Primer: HPV11 PR1**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): CGC AGA GAT ATA TGC ATA TGC

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6794,2Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 242,2**Pureza Padrão****Tm (1M Na⁺) 67****Tm (50 mM Na⁺) 45****%CG 42**

Número do Primer: D0482G05 (D05)

Tamanho do Primer: 21

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 28,0

nmoles por OD: 4,1

OD's 24,55 **$\mu\text{g}'\text{s}$ 688,68****nmoles 101,3**

Primer: HPV11PR2

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz
 Sequência (5' → 3'): AGT TCT AAG CAA CAG GCA CAC

Número do Primer: D0482D06 (D06)

Tamanho do Primer: 21

Escala de Síntese: 200 nmol

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6748,2Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 241,9 μg por OD: 27,9

nmoles por OD: 4,1

Pureza**Padrão****Tm (1M Na⁺)****69****OD's 22,44****Tm (50 mM Na⁺)****47** **μg 's 626,00****%CG****47****nmoles 92,6****Invitrogen Brasil Custom Primers****Certificado de Análise****LIFE TECHNOLOGIES****Número da Ordem:****002488 01****Primer: HPV16**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz
 Sequência (5' → 3'): TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA

Número do Primer: D0294F10 (F10)

Tamanho do Primer: 21

Escala de Síntese: 200 nmol

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6730,2Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 229,9 μg por OD: 29,2

nmoles por OD: 4,3

Pureza**Padrão****Tm (1M Na⁺)****69****OD's 25,14****Tm (50 mM Na⁺)****47** **μg 's 735,96****%CG****47****nmoles 109,3****Primer: HPV16**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz
 Sequência (5' → 3'): CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA

Número do Primer: D0294F11 (F11)

Tamanho do Primer: 21

Escala de Síntese: 200 nmol

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6767,2Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 224,2 μg por OD: 30,1

nmoles por OD: 4,4

Pureza**Padrão****Tm (1M Na⁺)****67****OD's 26,02****Tm (50 mM Na⁺)****45** **μg 's 785,38****%CG****42****nmoles 116,0****LIFE TECHNOLOGIES****Número da Ordem:****002488 01**

Invitrogen Brasil Custom Primers**Certificado de Análise****Primer: HPV18**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT

Peso Molecular (µg/µmol): 6774,2

Coef. Milimolar de Extringência (OD/µmol): 239,0

Pureza Padrão**Tm (1M Na⁺) 75****Tm (50 mM Na⁺) 53****%CG 61**Número do Primer: D0297F12 (**F12**)

Tamanho do Primer: 21

Escala de Síntese: 200 nmol

µg por OD: 28,3

nmoles por OD: 4,1

OD's 28,08**µg's 795,90****nmoles 117,3****Primer: HPV18**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT

Peso Molecular (µg/µmol): 7633,8

Coef. Milimolar de Extringência (OD/µmol): 225,9

Pureza Padrão**Tm (1M Na⁺) 72****Tm (50 mM Na⁺) 51****%CG 45**Número do Primer: D0294G01 (**G01**)

Tamanho do Primer: 24

Escala de Síntese: 200 nmol

µg por OD: 33,7

nmoles por OD: 4,4

OD's 38,66**µg's 1306,43****nmoles 171,2****Primer: HPV33**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG

Peso Molecular (µg/µmol): 6822,2

Coef. Milimolar de Extringência (OD/µmol): 254,8

Pureza Padrão**Tm (1M Na⁺) 71****Tm (50 mM Na⁺) 49****%CG 52**Número do Primer: D0294G02 (**G02**)

Tamanho do Primer: 21

Escala de Síntese: 200 nmol

µg por OD: 26,7

nmoles por OD: 3,9

OD's 31,95**µg's 855,45****nmoles 125,2**

Invitrogen Brasil Custom Primers**Certificado de Análise****Primer: HPV33**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6803,2Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 248,2**Pureza Padrão****Tm (1M Na⁺) 67****Tm (50 mM Na⁺) 45****%CG 42**

Número do Primer: D0294G03 (G03)

Tamanho do Primer: 21

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 27,4

nmoles por OD: 4,0

OD's 33,96 **μg 's 930,85****nmoles 136,8****Primer: HPV35**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6394,0Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 218,7**Pureza Padrão****Tm (1M Na⁺) 70****Tm (50 mM Na⁺) 49****%CG 55**

Número do Primer: D0294G04 (G04)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 29,2

nmoles por OD: 4,5

OD's 22,79 **μg 's 666,30****nmoles 104,1****Primer: HPV35**

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): GGG GCA CAC TAT TCC AAA TG

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6449,0Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 225,0**Pureza Padrão****Tm (1M Na⁺) 68****Tm (50 mM Na⁺) 47****%CG 50**

Número do Primer: D0294G05 (G05)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 28,6

nmoles por OD: 4,4

OD's 33,12 **μg 's 949,29****nmoles 147,0**

Invitrogen Brasil Custom Primers
Certificado de Análise

LIFE TECHNOLOGIES
Número da Ordem:
002488 01

Primer: HPV45

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz
Seqüência (5' → 3'): ACC AGA TTT GTG CAC AGA AT

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6448,0
Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 230,4

Pureza	Padrão
Tm (1M Na⁺)	64
Tm (50 mM Na⁺)	45
%CG	40

Número do Primer: D0294G06 (G06)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 27,9

nmoles por OD: 4,3

OD's 33,22

 μg 's 929,70

nmoles 144,1

Primer: HPV45

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz
Seqüência (5' → 3'): TTT TTT CCA GTG TCT CTC CA

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6323,0
Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 191,6

Pureza	Padrão
Tm (1M Na⁺)	64
Tm (50 mM Na⁺)	43
%CG	40

Número do Primer: D0294G07 (G07)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 33,0

nmoles por OD: 5,2

OD's 23,32

 μg 's 769,58

nmoles 121,7

Primer: HPV58

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz
Seqüência (5' → 3'): GGA CAT TGC ATG ATT TGT GT

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6501,0
Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 221,2

Pureza	Padrão
Tm (1M Na⁺)	64
Tm (50 mM Na⁺)	43
%CG	40

Número do Primer: D0294G08 (G08)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

 μg por OD: 29,3

nmoles por OD: 4,5

OD's 35,97

 μg 's 1057,15

nmoles 162,5

Invitrogen Brasil Custom Primers
Certificado de Análise

LIFE TECHNOLOGIES
Número da Ordem:
002488 01

Primer: HPV58

Pesquisador: Dr. Aparecido da Cruz

Seqüência (5' → 3'): TTT CTT GTG GAC ACA ATG GT

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 6461,0

Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 216,8

Pureza	Padrão
Tm (1M Na⁺)	64
Tm (50 mM Na⁺)	43
%CG	40

Número do Primer: D0294G08 (G09)

Tamanho do Primer: 20

Escala de Síntese: 200 nmol

μg por OD: 29,8

nmoles por OD: 4,6

OD's	29,11
μg's	867,53
nmoles	134,2

Primer: GAPDH – P1

Pesquisador: Dr^a Vera Aparecida Saddi

Seqüência (5' → 3'): CAG TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 517

Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 16,2

Pureza	Padrão
TD	69,30
Tm	76,0
%CG	77,29

Número do Primer: 249.479

OD's **16,2**

μg 's **517**

pmoles **70.625**

Primer: GAPDH –P2

Pesquisador: Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Seqüência (5' → 3'): TTG TCA TCA ATG GAA ATC CCA TCA

Peso Molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$): 382

Coef. Milimolar de Extringência (OD/ μmol): 12,3

Pureza	Padrão
TD	69,42
Tm	66,0
%CG	68,75

Número do Primer: 249.478

OD's **12,3**

μg 's **382**

pmoles **52.299**

Anexo 8 – Submissão do artigo

O artigo foi submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*.

A resposta da submissão foi encaminhada via email:

Manuscript Submission to Genetics and Molecular Biology

[Caixa de entrada](#)

☆ de **Editor/GMB** <editor@gmb.org.br> [ocultar detalhes](#) 25 mar (1 dia atrás) [Responder](#) | ▾

para ● niellananda@gmail.com

data 25/03/2008 09:28

assunto Manuscript Submission to Genetics and Molecular Biology

Prezada Antoniella,

O manuscrito foi submetido à revista e provisoriamente recebeu o número MS2008/076.

Solicitamos ao autor correspondente o envio de uma carta de submissão, assinada por ele contendo o e-mail de todos os co-autores, para que possamos enviar a confirmação da submissão a todos os autores.

Atenciosamente,

Tamires Cianci

Assistente GMB

Angela M. Vianna-Morgante

Editor

Genetics and Molecular Biology

editor@gmb.org.br

Carta de submissão do autor correspondente



Goiânia, March, 24th, 2008.

Dear Dr Angela M. Vianna-Morgante,


Thank you for your kind remainder regarding our manuscript to which was provisionally assigned the number: MS2008/076.

I gladly inform you that all the authors listed below have approved the submission of the manuscript to GMB. Please, feel free to contact them at your convenience.

Antoniella Fernanda Mendanha Sousa – niellananda@gmail.com
Adriano Augusto Peclat de Paula – adrianopaula@brturbo.com.br
Angela Adamski da Silva Reis – angeladamski@gmail.com
Aparecido Divino da Cruz – acruz@ucg.br

We thank you for considering our manuscript and wish you and GMB the best of luck. If you need any further information please, do not hesitate to contact me.

Best regards,


Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.

Núcleo de Pesquisas Replicon

Av. Universitária, 1069 – Setor Universitário – CEP 74605-010 – Goiânia – Goiás
Tel: (0xx62) 3946-1385

Carta de submissão da revista

MS2008/076 Genetics and Molecular Biology [Caixa de entrada](#)

☆ de **Editor/GMB** <editor@gmb.org.br> [ocultar detalhes](#) 25 mar (21 horas atrás) [Responder](#)

para acruz@ucg.br

cc ● niellananda@gmail.com,
adrianopaula@brturbo.com.br,
● angeladamski@gmail.com

data 25/03/2008 16:21

assunto MS2008/076 Genetics and Molecular Biology

Subject: MS2008/076 - Detection and Genotyping of Human Papillomavirus in Penile Squamous Cell Carcinoma

Dear Dr. Cruz,

We acknowledge receipt of the abovementioned manuscript, to which has been assigned the following number: MS2008/076.

Please refer to the manuscript number whenever you contact us.

We thank you for submitting your paper to *Genetics and Molecular Biology*.

Yours sincerely,

Angela M. Vianna-Morgante

Editor

Genetics and Molecular Biology

editor@gmb.org.br

Anexo 9 – Artigo

Detection and Genotyping of Human Papilomavirus in Penile Squamous Cell Carcinoma

Antoniella Fernanda Mendanha Sousa^{1,2}, Adriano Augusto Peclat de Paula³,
Angela Adamski da Silva Reis², Aparecido Divino da Cruz^{1,2}.

¹ *Strictu Sensu Graduate Program in Genetics - Universidade Católica de Goiás (UCG), Goiânia, GO, Brasil.*

² *Research Center Replicon - Universidade Católica de Goiás (UCG), Goiânia, GO, Brasil.*

³ *Urology Service - Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ASSG), Goiânia, GO, Brasil.*

Abstract

The penile cancer is a rare type of neoplasia which attacks individuals frequently among the fourth and seventh decade of life. This may be found in underdeveloped countries with poor hygienic habits and associated with fimose and non-circumcised men. Epidemiologic and molecular studies have found out associations with the HPV and the carcinoma of the penile being the subtypes of high oncogenic risk more frequent. The objectives of this study were to detect and genotype HPV in biological species of penian tumors and also to determine possible associations between the presence of viral types and clinic-pathological aspects. After the extraction of DNA, the samples were subjected to reactions of PCR with the *primers* GAPDH, GP5+/6+ and specific type as an intern reaction control, detection of HPV and genotype respectively. In the molecular assessment, the group of *primers* GAPDH presented themselves amplified in all analysed samples. The amplification for the viral genoma with the *primers* GP5+/6+ was observed in 34,48% and the most frequent HPV found was number 16. The studies about the association between the HPV and the penile tumors are important because they may assess the relation of this virus with the initiation process and promotion of tumors together with other risky factors, such as fimose, poor hygienic habits, smoking and promiscuity.

Key words: penile cancer, SCC, HPV, PCR, molecular genotype.

Please, send mail to Aparecido Divino da Cruz, Ph.D., Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Go., Brazil. **E-mail:** acruz@ucg.br

Introduction

The penile cancer constitutes a rare neoplasia in developed countries, such as the United States and some countries in Europe. This type of cancer corresponds to 0.4% of malign neoplasias (Droller, 1980). Besides presenting indices of severe morbidity and mortality, the penile cancer is an illness that causes meaningful psychological damages and it has grown in a dramatic form in many parts of the world (Micali *et al.*, 2006).

In Brazil its incidence varies according to the region studied. It varies from 5,5% to 16% in the Northern and Northeastern regions; 1% to 4% in the Southern and Southeastern regions (Griffiths & Mellon, 1999); and 3,8% in the Central-Western region (Júnior *et al.*, 1984). The incidence of this type of cancer happens between the fourth and seventh decades of life with 97% of the cases represented by epidermoid carcinoma. However, young individuals can also be affected. Patients who are under 40 years of age represent approximately 22% of the cases (Reis, 2005).

Penile cancer's ethiology still remains obscure. However, the presence of fimose, poor hygienic habits, a great number of sexual partners and some infectious agents such as the Human Papillomavirus (HPV) are considered as high risky factors for the development of this neoplasia (Barrasso *et al.*, 1987; Maiche, 1992; Maden *et al.*, 1993).

In Brazil, McCance *et al.* and supporters (1986) and Villa (1997) using the Southern blot technique found the HPV presence in 44,4% (8/18) and 50,9% (27/53) of patients respectively in species of carcinoma of the penile. Gross and Fister (1993) related the HPV presence in individuals with penile cancer, varying according to the histological type, 100% in the carcinoma in situ, 47,4% in the basiloide carcinoma and 35% in the conventional squamous carcinoma. Therefore, literary data support the association of the HPV genoma with the penile cancer cases (McCance *et al.*, 1986; Neves *et al.*, 2002; Micali *et al.*, 2006).

The HPV is able to alter the cell cycle for the expression of the viral protein E6 and E7 in the inactivity and elimination of the products of tumor suppressor genes (p53 and Rb). The loss of function of both proteins responsible for the tumoral suppression contributes for the progression of the neoplastic process. In general the Rb activity is inhibited by the E7 viral protein while the p53 is degraded subsequently to the connection with E6 viral protein (Reis, 2005; Souto *et al.*, 2005; Porche, 2007). The interactions between the viral protein and the cell proteins alter the control of the cell cycle, making the viral infection a potent factor of

initiation and promotion of tumors. All variables involved in the carcinogenesis must be assessed in group so that the relative risks and the infection prognostics may be established (Reis, 2005).

The progress in understanding the ethiology, pathogenesis and a more accurate prognostic of the malign penile tumors have been slow due to the lack of molecular studies that investigate the probable genetic alterations, clinical aspects and biological agents like the HPV, associated to the development and progression of this neoplasia. For this reason, the association between the HPV and the penile cancer was proposed to be investigated.

Material and Methodology

The material of this study consists of 29 patients diagnosed with a penile tumor at the Urology Service of Hospital Araújo Jorge (SU – HAJ) in Goiânia – Goiás. The 29 frozen penile tumor samples were taken to the Research Center – Replicon (NPR) of Universidade Católica de Goiás (UCG) for DNA extraction. After the extraction, a PCR was accomplished with a group of *primers* Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)l. This set of *primers* amplifies a 99pb region which is: F: Forward (Sensus): CAG TGG ACT CCA CGA CGT ACT CAG and R: Reverse (Anti-sensus): TTG TCA TCA ATG GAA ATC CCA TCA (Batista *et al*, 2007).

The PCR was accomplished having as final volume 25µL of mix containing DNA, 2,5 µM of each *primer*, 1X patch, dNTP at 0,25 mM, 2,0 mM of MgCl₂, 1U of Taq DNA polimerasis and H₂O milliQ for 25 µL. The amplifications happened in a thermociclador with 1 cycle of initial denaturization at 94°C for 5 minutes, 35 cycles divided into: cyclic denaturization at 94°C for 0,5 minutes, annealing at 59°C for 1 minute and cyclic extension at 72°C for 1 minute, 1 cycle of final extension at 72°C for 7 minutes and rest at 4°C.

For the detection of HPV a set of generic *primer* was used, the GP5+/6+ which amplifies the L1 region of the viral capsideo. This *primer* amplifies a fragment of 150 pb which is: F: Forward (Sensus): TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC and R: Reverse (Anti-sensus): GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C. The protocols for the executions of PCR reactions for the HPV detection were optimized from the protocols suggested in literature (Reis, 2005), and 25 µL of mix containing DNA, 15 pmol of each *primer*, 1X patch, dNTP at 0,2 mM, 3 mM of MgCl₂, 1U of Taq DNA polimerasis and H₂O

milliQ for 25 μ L. The amplifications took place in a thermociclador with 1 cycle of Initial Denaturization at 95°C for 5 minutes, 40 cycles divided into: cyclic denaturization at 95°C for 0,3 minutes, annealing at 50°C for 2 minutes and cyclic extension at 72°C for 7 minutes, and rest at 4°C. all detection analysis were made in triplicate.

After the HPV detection the genotyping was made in the samples which presented to be amplified by the *primer* GP5+/6+. The specific type *primers* used to genotype the HPVs were: 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 and 58 (Karlsen et al., 1996). The size of the fragments (molecular weight) amplified by these specific type *primers* and the respective regions were: HPV6: 195pb (F: Forward (Sensus): CAC GTC TGC AAC GAC CAT AG and R: Reverse (Anti-sensus): CCA TGA AAT TCT AGG CAG CA), HPV 11: 90pb (F: Forward (Sensus): CGC AGA GAT ATA TGC ATA TGC and R: Reverse (Anti-sensus): AGT TCT AAG CAA CAG GCA CAC), HPV 16: 119pb (F: Forward (Sensus): TCA AAG CCA CTG TGT CCT GA and R: Reverse (Anti-sensus): CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA), HPV 18: 172pb (F: Forward (Sensus): CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT and R: Reverse (Anti-sensus): TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT), HPV 33: 211pb (F: Forward (Sensus): AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG and R: Reverse (Anti-sensus): ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG), HPV 35: 230pb (F: Forward (Sensus): CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA and R: Reverse (Anti-sensus): GGG GCA CAC TAT TCC AAA TG), HPV 45: 236pb (F: Forward (Sensus): ACC AGA TTT GTG CAC AGA AT and R: Reverse (Anti-sensus): TTT TTT CCA GTG TCT CTC CA) and HPV 58: 314pb (F: Forward (Sensus): GGA CAT TGC ATG ATT TGT GT and R: Reverse (Anti-sensus): TTT CTT GTG GAC ACA ATG GT).

The protocols for the execution of these reactions of PCR for genotyping were also optimized from the protocols suggested in literature (Reis, 2005), and they were: 25 μ L of mix containing DNA, 15 pmol of each *primer*, 1X patch, dNTP at 0,2 mM , 3,6 mM of MgCl₂, 1U of Taq DNA polimerasis and H₂O miliQ for 25 μ L. The amplifications took place in a thermociclador with 1 cycle of Initial Denaturization at 94°C for 10 minutes, 10 cycles divided into: cyclic denaturization at 94°C for 1 minute, annealing at 51°C for 1 minute and cyclic extension at 72°C for 1 minute, 35 cycles divided into: 1 cycle of cyclic denaturization at 94°C for 1 minute, annealing at 46°C for 1 minute, 1 cycle of final extension at 72°C for 1 minute and rest at 4°C. All results were confirmed in duplicate and in triplicate whenever a new testing was needed.

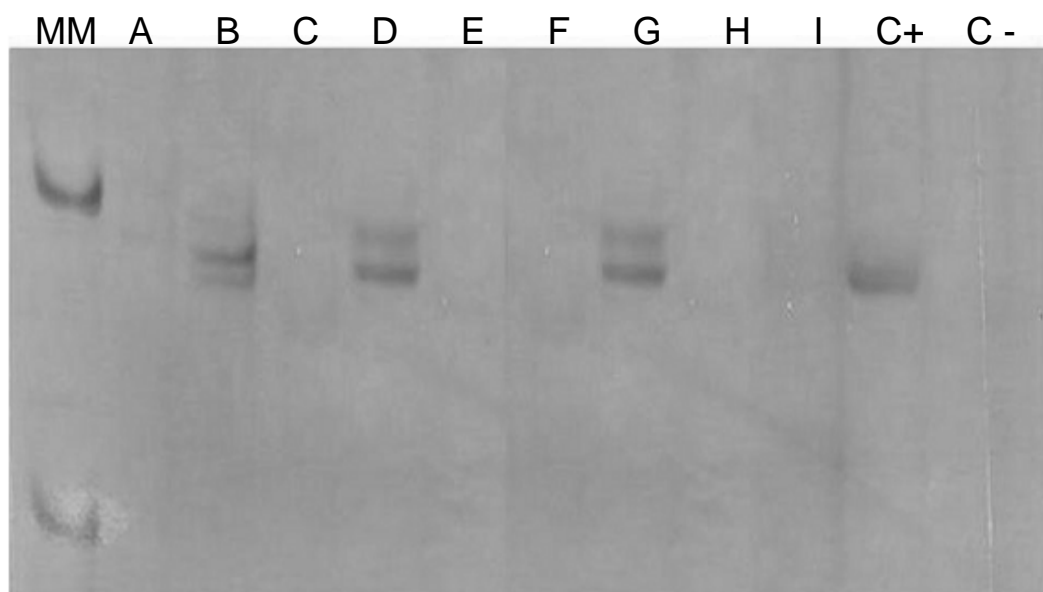
The PCR products were analysed through electrophoresis in poliacrilamida gel at 8%. Later on, the gels were submitted to a 10V/cm for an average time of 3 hours. Following electrophoresis, the DNA was visualized by silver nitrate staining process.

Results

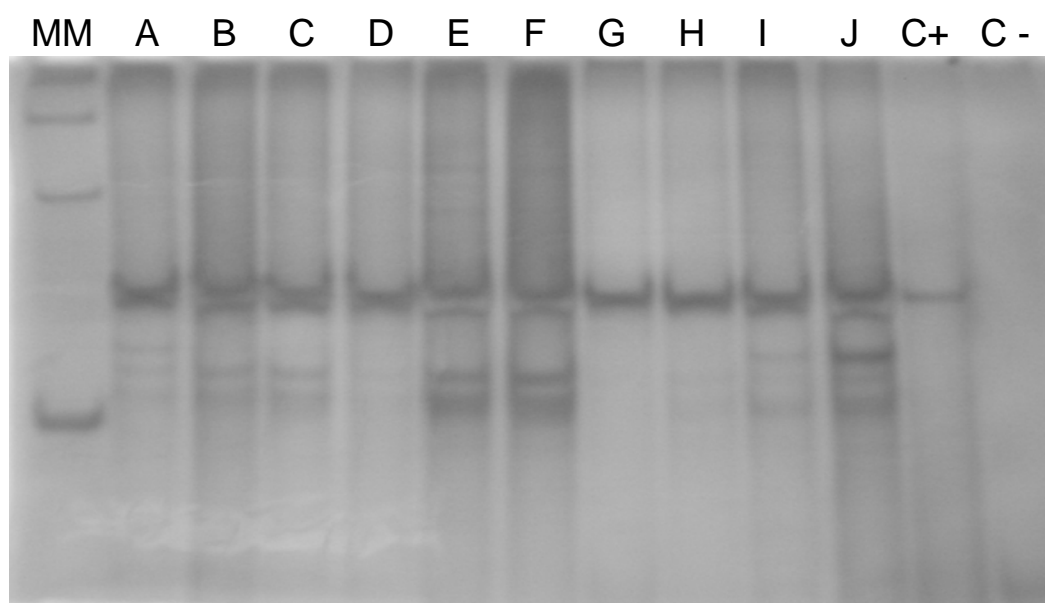
It was not possible to collect date from four patients because their prontuaries were censored. Consequently, the statistics which refer to the prontuary date such as hystological type, tumor size, staging, among others were made in accordance with the prontuaries found which correspond to a total of 25 patients. The statistics which refer to the molecular analysis were made in accordance with the total number of patients (29), once they were all submitted to PCR reactions. The average age was 61,5 . For topography were observed 24% for shaft (6/25), 28% for glans (7/25), 16% for glans and prepuce (4/25), 12% for glans and haste (3/25), 8% for prepuce (2/25) and 12% for other specifications (3/25). In the analysis of the clinic-pathologic aspects, the type of lesion varied (ulcerated lesion, vegetative lesion, hard lesion, and others) and the morphology of biggest prevail was the invasor squamous carcinoma varying from degree I to IV.

In the staging (Jackson's classification), we observed 32% for Jackson I (8/25), 36% for Jackson II (9/25), 24% for Jackson III (6/25), and 8% for Jackson IV (2/25). From the total number of patients, 20% were smokers (5/25), 4% were ethilic users, 12% smokers and ethilic users (3/25) and 20% were former smokers of former ethilic users (5/25). 72% of the patients presented fimose (18/25), 32% of the patients presented methastasis (8/25), and 8% had a former history of STD (2/25). The chosen treatment was a partial penectomy.

The viral genoma was detected in 10 out of the 29 samples (34,5%)(Picture 1). The HPV 6 genoma was amplified in 20% of the samples (2/10), the HPV 11 in 30% (3/10), the HPV 16 was detected in 100% of the samples with GP5+/6+ positive (10/10) (Picture 2) and the HPV 18 in 30% (3/10) of the samples. The HPV 33 was detected in 10% of the samples (1/10), the HPV 35 in 30% (3/10) and the HPVs 45 and 58 were not found.



Picture 1. Poliacrilamida Gel at 8% colored with Silver Nitrate bearing products of amplification for the detection of HPV using the generic GP5+/6+ *primer*. A sample of HPV 16 previously genotyped was used as a positive control. 50pb sized molecular marker. Patients B, D and G considered positive.



Picture 2. Poliacrilamida Gel at 8% colored with Silver Nitrate bearing the PCR products for genotyping of HPV using a specific HPV 16 *primer*. 100 pb sized molecular marker. Fragment size of HPV 16 – 119 pb. A sample of HPV 16 previously genotyped was used as a positive control.

Discussion

The prevailing aging limit was between the sixth and the seventh life decade which is in accordance with the literary data (Gil *et al.*, 2001; Reis, 2005). The glans, the shaft and the prepuce were the most frequently attacked topographies, and according to Young *et al.* (2000) when the location is on glans and superficial, there is a tendency to have the corion invaded, and progressively, the corpus cavernosum and the ureter. The cases that have a prepuccial origin infiltrate the lamina propria, the dartos and the skin, and because they are generally superficial and more differentiated, they tend to be less aggressive (Young *et al.*, 2000).

In all patients, the prevailing morphology was the squamous carcinoma and the Jackson II classification. According to some authors, from 95% to 97% of malign penile tumor cases are represented by the epidermoid carcinoma, also known as espinocelular or squamous carcinoma (De Paula *et al.*, 2005). The types of lesions detected were ulcerated ones, vegetative, infiltrating, fistulas, hard lesions and areas with necrosis.

In 1987 Hellberg *et al.* described the smoking habit as a risky factor for neoplasies and they concluded that this relation happens in 98% of the cases of epithelial cancer (Hellberg *et al.*, 1987). In that study, 20% of the patients were smokers and at least 20% more had used tobacco in the past.

Literature describes the incidence of fimose among patients with penile cancer from 44 to 85% (Micali *et al.*, 2006), and in this study a number equivalent to 72% was found (18/25). This indicated that although it may not be elucidated, the presence of fimose may be related to the growing of penile cancer cases. It is also known that the lack of circumcision may make it difficult to have the glans properly cleaned, which associated to the presence of *Mycobacterium smegmatis* may contribute to the formation of penian tumor as well as cause a chronic irritation of the epithelium (De Paula *et al.*, 2005).

8 out of 25 patients presented methastasis (32%), and 6 out of 8 (24%) had their lymph nodes attacked. According to De Paula *et al.*, when two or more lymph nodes are injured, they reflect a higher risk of recidivism and death due to this illness (De Paula *et al.*, 2005).

A former history of STD was related by 2 out of 25 patients (8%), but only for one of them the amplification for GP5+/6+ was positive. The most common forms of treatment were partial amputation, partial amputation with lymphadenectomy, total amputation, total amputation with lymphadenectomy, excision and local resection, inguinal emptying and perineal urethrostomy.

The HPV DNA was detected in 34,48% of the cases (10/29). These data corroborate the ones found in literature, once Prowse *et al* relate to have found infections caused by HPV in 54% of the penile cancer cases studied by them, and Lont *et al* have found 30% of them (Prowse *et al*, 2008; Lont *et al*, 2006).

The HPV 16 was the most found viral type, being identified in all positive samples for the genoma of the HPV which is consistent with the data found in literature (Heideman *et al*, 2007; Castellsagué *et al*, 2002; Rubin *et al*, 2001; De Paula *et al*, 2005). These results may indicate that this specific type of HPV can be associated with the development of penile cancer (Giuliano, 2007; De Paula *et al*, 2005).

Other types of HPV were relatively less common. The low risky HPV identified were HPV6 in 20% of the tumors (2/10) and the HPV11 in 30% (3/10) of the cases. The high risky ones found were HPV 18, HPV 33 and HPV 35. HPV 18 was identified in 30% (3/10), HPV 33 in 10% (1/10) and HPV 35 in 30% (3/10) of the cases. Several authors relate to have found HPV 18 as the second more common (Castellsagué *et al*, 2002). HPVs 6 and 11 are frequently linked to the development of condilomas (Giuliano, 2007), and also to the benign infections of the genital tractus. They are generally present in most infections clinically caused by the virus. Normally these types are not associated with displasies when hystopathologically examined. Types 16 and 18, mainly, and less frequently types 33,35, and 45 are associated with infections with displasy of low and high degree and also with the penile carcinoma or cervical cancer (Gil *et al*, 2002).

HPV 16 was found in 60% of the cases in co-infection with other types of HPV (6, 11, 18, and 33). Only 40% of the patients did not present multiple infections.

The study of the association between the penile cancer and the HPV infection is important to determine the prevailing of this virus in the penian tumor cases and also to analyze the possible influence of this genoma in the ethiology of these tumors.

After having performed this study, we can say that the HPV may be related to the process of initiation and promotion of tumors, together with other ethiological agents, such as, fimose, poor hygienic habits, smoking habits and promiscuity. However, there is a necessity for more studies in this field which point out how these factors may enlarge the risks of penile cancer.

References

- Barrasso R, Debrux J, Croissant O, Orth G.: *High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. N Engl J Med* 1987; 317:916-23.
- Batista JJ, Martins AS, Moro L, Resende JS, Martins NRS, Vasconcelos AC. *Apoptosis and expression of VP2 and GADPH in an experimental infectious bursal disease in SPF chicks. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2007, v.59, n.2, p.313-320.
- Castellsagué X, M.D., Bosch X, M.D., Munoz N, M.D., Chris J.L.M. Meijer, Ph.D., Keerti V. Shah, Dr.P.H., de Sanjosé S, M.D., Eluf-Neto J, M.D., Ngelangel CA, M.D., Chichareon S, M.D., Smith JS, Ph.D., Herrero R, M.D., Franceschi S, M.D., for International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. : *Male Circumcision, Penile Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer in Female Partners. New England Journal of Medicine*, 2002 vl. 346, n. 15.
- De Paula AAP, Netto JCA, Da Cruz AD, Júnior RF. *Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. Revista Brasileira de Cancerologia* 2005; 51(3): 243-252
- Droller MJ. *Carcinoma of the pênis an overview. Urol Clin North Am* 1980; 7: 783-4.
- Gil A.O., Pompeo A.C.L., Goldstein P.J., Saldanha L.B., Mesquita J.L.B., Arap S.: *Analysis of the Association Between Human Papillomavirus with Penile Carcinoma. Brazilian Journal of Urology* 2001, 27: 461-468.
- Gil A.O., Pompeo A.C.L., Goldstein P.J., Saldanha L.B., Mesquita J.L.B., Arap S.: *Analysis of the Association Between Human Papillomavirus with Penile Carcinoma. Brazilian Journal of Urology. 2002; 28*
- Giuliano AR. *Human papillomavirus vaccination in males. Gynecologic Oncology* 2007; 107-S24-S26

Griffiths TRL & Mellon JK. Human Papillomavirus and Urological tumours: I. *Basic science and role in penile cancer. Brazilian Journal of Urology* 1999, 84: 579 - 586.

Gross G, Fister HP. *Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. Med Microbiol Immuno (Berl).* 1993; 193(1): 35-44

Heideman DAM, Waterboer T, Pawlita M, Diemen PDV, Nindl I, Leijte JA, Bonfrer JMG, Horenblas S, Meijer CJLM, Snijders PJF. *Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. J Clin Oncol* 2007; 25: 4550-4556

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. *Penile câncer: Is there an epidemiological role for smoking and sexual behavior? British Medical Journal* November 1987; v 295 - 21

Júnior AAB., Athanázio PRF., Oliveira B.: *Câncer do Pênis: Estudo da sua patologia geográfica no Estado da Bahia, Brasil. Rev. Saúde Públ., S. Paulo,* 1984: 18:429 – 35.

Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristenseng, Holm R, Johansson B and Hagmar B. *Use of multiple PCR primers sets for optimal detection of Human Papillomavirus. Journal Clinical Microbiology* 1996, 34 (09): 2095 - 2100.

Lont AP, Kroon BK, Horenblas S *et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. Int J Cancer* 2006; 119:1078-81

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

Maiche A.G.: *Epidemiological aspects of the cancer of the penile in Finland. Eur J Cancer Prev* 1992; 1:153-158.

McCance DJ, Kalache A, Ashdown K, Andrade L, Menezes F, Smith P, *et al.* *Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penile from Brazil.* Int J Cancer. 1986; 37 (1): 55-59.

Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. *Penile Cancer* 2006; 54: 369-91

Neves D, Camara GNL, Alencar TR, da Cruz MR, Martins CRF, Carvalho LGS. *Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma.* Braz J Urol 2002; 28(3):221-226.

Porche DJ. *Genital Human Papillomavirus Infection in Men.* MEN'S HEALTH. The Journal for Nurse Practitioners – JNP, 2007- November/December.

Prowse DM, Ktori EM, Chandrasekaran D, Prapa A, Baithun S. *Human papillomavirus-associated increase in p16(INK4A) expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma.* Journal Compilation. British Association of Dermatologists. British Journal of Dermatology – 2008, 158, pp261–265,

Reis AAS.: *O papel do Papiloma Vírus Humano na carcinogênese dos tumores dos tumores de pênis: uma abordagem epidemiológica e molecular.* (Dissertação de Mestrado em Genética) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, 2005 – Goiânia.

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WGV and Pirog EC. *Detection and typing of Human Papillomavirus DNA in penile carcinoma.* American Journal of Pathology 2001, 159 (4): 1211 – 1218.

Souto R, Falhari JPB, Cruz AD.: *O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias.* The Human papillomavirus: a factor related with the formation of neoplasias. Revista Brasileira de Cancerologia 2005; 51(2): 155-160

Villa LL. *Human papillomaviruses and cervical cancer.* Adv Cancer Res. 1997; 71:321-341

Young RH, Srigley JR, Amin MB. *Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra and penile: Armed Forces Institute of Pathology Fascicle, Third Series.* Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 2000.